

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**ESTUDIO DE TOLERANCIA Y SEGURIDAD DE TRES FORMULACIONES DE
UN ANTIBIÓTICO MACRÓLIDO APLICADO POR VÍA SUBCUTÁNEA EN
GANADO BOVINO DE CARNE**

POR

RAMIRO LÓPEZ RINCÓN

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

NOVIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



ESTUDIO DE TOLERANCIA Y SEGURIDAD DE TRES FORMULACIONES DE
UN ANTIBIÓTICO MACRÓLIDO APLICADO POR VÍA SUBCUTÁNEA EN
GANADO BOVINO DE CARNE

Ramón A. Delgado G.

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
ASESOR PRINCIPAL

Gonzalo López Rincón

DR. GONZALO LÓPEZ RINCÓN
ASESOR EXTERNO

Ramón A. Delgado G.

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
PRESIDENTE

MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
VOCAL

MC. ARACELY ZUÑIGA SERRANO
VOCAL

DR. CARLOS A. ELIZONDO VÁZQUEZ
VOCAL SUPLENTE

DEDICATORIAS

A mi esposa Lorenza

El amor de mi vida sin lugar a duda. Quien ha compartido a lo largo de los años penas y alegrías a causa de la lucha diaria para que nuestra familia pueda resistir y vencer la difícil prueba del tiempo y la distancia, sin tu invaluable apoyo no lo habría logrado... Hoy y siempre TE AMO.

A mi hijo Julio Alejandro

Por haberme permitido compartir un poco del tiempo perdido en el cual me dio el privilegio de vivir conmigo y llegar a compartir las aulas de clase de la facultad, laboratorios, quirófano y viajes de práctica de estudio... por ser mi mejor compañero. Pronto no habrá más excusas para estar juntos y esta vez para siempre...TE AMO.

A mis padres Gudelia y Marciano

Por darme las mejores enseñanzas de la vida, por los valores que permitieron formarme como una persona íntegra. Por su invaluable apoyo, además de todos sus consejos en los momentos más amargos que me ha ofrecido la vida, pero sobre todo por enseñarme a ser persistente y continuar luchando hasta alcanzar mis metas y sueños... MIS VIEJOS LOS QUIERO MUCHO.

A mis hermanos Juan Carlos, Andrés , Everardo y Gonzalo

Por su apoyo, consejos, regaños que en un tiempo no supe escuchar y que solo pretendían enseñarme que nada en la vida es casualidad...LOS QUIERO MUCHO.

A la familia Suárez González

José Luis y Yolanda por demostrarme que el concepto "hermano" va mucho más allá de solo lazos sanguíneos y hacerme sentir parte de su familia.

AGRADECIMIENTOS

A la UAAAN UL y su plantilla Docente.

Por darme la oportunidad de recibir las cátedras y desarrollar las destrezas necesarias para una formación profesional íntegra y de calidad.

Al M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González.

Por dirigir este trabajo de tesis y brindarme todas las facilidades y compartiendo su enorme experiencia algunos de los tantos conocimientos que ha adquirido en su vida profesional.

A el Dr. Gonzalo López Rincón.

Asesor externo de este trabajo de investigación. Quien además de los lazos familiares compartimos el gusto y la pasión por la Medicina Veterinaria. Profesional dedicado a la investigación, que significa un modelo a seguir y un ejemplo que cuando se tiene voluntad y convicción no existe meta que no se puede alcanzar.

A Laboratorios Virbac SA de CV.

Por facilitarme el acceso al Departamento de Desarrollo Clínico e Investigación, y contribuir en varios proyectos durante mi estancia de prácticas profesionales en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ).

A mi H. Jurado Examinador

MC. Ramón Alfredo Delgado González, MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez, MC. Aracely Zúñiga Serrano, Dr. Carlos A. Elizondo Vázquez. Por sus revisiones y acertadas correcciones para poder elaborar un buen trabajo.

A la Dra. Ilda Graciela Fernández García.

Por darme la oportunidad de realizar mi servicio social en su proyecto de investigación en el Centro de Investigación y Reproducción Caprina. Y formar parte de su equipo de trabajo.

A la Dra Ma. Hortensia Cepeda Elizalde.

Por ser mi tutora durante mi estancia en esta Universidad y siempre estar pendiente de mi formación académica.

A mis maestros

Dr. Carlos Leyva Orasma, Dr. Luis Felipe Alvarado Martínez, MVZ. Silvestre Moreno Avalos, MVZ. Carlos Raúl Rascon Díaz. Por ser unos excelentes catedráticos además de unas personas excepcionales, por su enorme apoyo y sobre todo por su infinita amistad que siempre manifestaron para mi hijo y para mi en momentos difíciles.

A la MVZ Xochitl Hernandez Peña

Por su apoyo incondicional, por compartir estos años de formación académica y por siempre tener una palabra y un consejo cuantas veces lo necesite.

A el MVZ Luis Antonio Cortes Martínez

Por ser un gran amigo, un excelente compadre y un gran hermano. Por estar en las buenas y las peores.

A la Srta. Ana Laura Chavez Cabrera

Por ser mi mejor amiga y compartir conmigo la adaptación a la UAAAN, y hacerme más amenas las muchas horas de clase, las tareas, los proyectos. Pero sobre todo, por ser una persona que me me brindó todo para hacer de la Laguna por cinco años mi hogar.

A TODOS USTEDES MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	JUSTIFICACIÓN	2
III.	OBJETIVOS	3
	3.1. Objetivo General	3
	3.2. Objetivos Específicos	3
IV.	HIPÓTESIS	3
V.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
	5.1. Origen de los macrólidos	4
	5.2. Estructura química	5
	5.3. Clasificación	6
	5.4. Mecanismo de acción de los antibióticos macrólidos	8
	5.5. Espectro de acción	9
	5.6. Uso de macrólidos en humanos	10
	5.7. Uso de macrólidos en medicina veterinaria	12
	5.7.1. Macrólidos más utilizados en medicina veterinaria.	13
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
	6.1. Unidad experimental	16
	6.2. Tratamientos	17
	6.3. Selección de animales	17
	6.4. Manejo de los animales	17
	6.5. Descripción, Posología y vía de administración de los productos en investigación	19
	6.6. Metodología para la aplicación de los productos en investigación	20
	6.7. Variables a evaluar	21
	6.7.1. Revisión clínica del sitio de aplicación (tolerancia local)	21
	6.8. Diseño experimental	22
	6.9. Descripción de la metodología estadística	22
	6.9.1. Determinación del tamaño de la muestra	22
	6.9.2. Verificación de la adecuada asignación aleatoria	22
	6.10. Análisis de las variables	23
	6.10.1. Datos de tolerancia local	23

6.10.2	Registros de consumo de alimento y ganancia de peso	23
6.11	Manejo de datos y registros	23
6.12	Eventos adversos y su relación con el fármaco	23
6.12.1	Identificación y categorización de los eventos adversos	23
6.12.2	Severidad de eventos adversos durante el estudio	24
6.12.3	Relación de los eventos adversos con el fármaco en prueba	24
6.12.4	Procedimientos de diagnóstico en relación al evento adverso	25
6.12.5	Procedimientos de terapéuticos en relación al evento adverso	25
6.13	Evaluación, seguridad y consumo	25
6.13.1	Evaluación de tolerancia y seguridad	25
6.13.2	Estudios de hemograma y bioquímica sanguínea	26
6.14	Bienestar animal	26
VII.	RESULTADOS	27
7.1	Conformación de grupos de trabajo	27
7.2	El producto macrólido en sus tres formulaciones altera constantes fisiológicas	31
7.3	Aplicación de las diferentes fórmulas del antibiótico macrólido y consumo de alimento	34
7.4	Las tres formulaciones del producto de prueba indujeron inflamación en el sitio de aplicación	36
VIII.	DISCUSIÓN.	38
IX.	CONCLUSIONES	40
X.	PERSPECTIVAS	40
XI.	LITERATURA CITADA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación tradicional de macrólidos.	6
Cuadro 2. Espectro de acción de los macrólidos.	10
Cuadro 3. Vías de administración reportadas en la literatura para macrólidos.	11
Cuadro 4. Condiciones de tratamiento aplicado a cada grupo.	16
Cuadro 5. Régimen de tratamientos.	21
Cuadro 6. Parámetros clínicos evaluados en los animales de estudio.	21
Cuadro 7. Valores hematológicos de referencia en bovinos.	28
Cuadro 8. Valores hematológicos encontrados en los animales de estudio.	28
Cuadro 9. Valores de referencia de químicas sanguíneas en bovinos.	29
Cuadro 10. Valores de químicas sanguíneas encontrados en los animales de estudio.	29
Cuadro 11. Constantes fisiológicas de los grupos de trabajo al inicio de la fase experimental.	30
Cuadro 12. Evaluación de parámetros de inflamación.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Antibióticos de la familia de macrólidos.	4
Figura 2. Estructura química del primer macrólido: picromicina	5
Figura 3. Zona de aplicación del fármaco en evaluación	20
Figura 4. Temperatura corporal 14 días post tratamiento	31
Figura 5. Frecuencia respiratoria 14 días post tratamiento	32
Figura 6. Frecuencia cardiaca 14 días post tratamiento	33
Figura 7. Consumo de alimento promedio por animal durante la fase experimental	34
Figura 8. Consumo de alimento por día de los animales bajo estudio.	35
Figura 9. Áreas de inflamación a diferentes días post tratamiento de tres lotes diferentes	36

RESUMEN

La farmacovigilancia es una actividad dirigida a la detección y estudio de reacciones adversas a medicamentos una vez que el fármaco se comercializa tras la correspondiente autorización. Con fundamento en lo mencionado este trabajo tiene como objetivo realizar estudios de seguridad y tolerancia de tres diferentes formulaciones de un antibiótico macrólido en desarrollo, evaluando y comparando tolerancia y seguridad clínica del fármaco macrólido aplicado por vía subcutánea en la tabla del cuello en ganado bovino. Con esta investigación se pretende contribuir a generar la infraestructura tecnológica y el desarrollo científico necesarios para la producción de una formulación de un fármaco capaz de ejercer su acción antibiótica sin alterar condiciones fisiológicas y provocar reacciones adversas. Se demuestra que a una dosis de 12 mg/kg se inducen reacciones adversas que modifican las constantes fisiológicas de los animales tratados. Al evaluar la tolerancia determinada por el grado de inflamación en el sitio de aplicación se determinó que el elemento de prueba provocó un proceso inflamatorio en la todos los animales inoculados independientemente de la formulación. En base a estos resultados se infiere que la fórmula del antibiótico F manifestó una involución más rápida, comparada con la fórmula A y K.

Palabras clave: antibiótico, bovinos, inflamación. macrólido, tolerancia, seguridad.

I. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos como bacterias, hongos y actinomicetos, algunos con función bacteriostática, es decir, que inhiben el crecimiento de bacterias, o bactericida, que matan bacterias (Madigan *et al.*, 1999). El efecto bactericida o bacteriostático de un antibiótico depende de su concentración y estabilidad así como del tipo de microorganismo, del inóculo y de la fase de proliferación en que se encuentre (González-Pedraza *et al.*, 2002).

La palabra antibiótico tiene su origen en "anti " y " bios " , palabras griegas que significan " contra " y " vida "cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Existe gran variedad de antibióticos que han sido agrupados con base a su naturaleza química, tipo de bacteria que inhiben, de acuerdo a la magnitud de su efecto y mecanismo de acción (Madigan *et al.*, 1999).

La primera observación de lo que hoy en día se denominaría efecto antibiótico fue realizada en el siglo XIX por el químico francés Louis Pasteur, al descubrir que algunas bacterias saprofitas podían destruir gérmenes del carbunco (enfermedad también conocida como ántrax). De acuerdo a Mensa *et al.* (2003), hacia 1900, el bacteriólogo alemán Rudolf Von Emmerich aisló una sustancia capaz de destruir los gérmenes del cólera y la difteria en un tubo de ensayo. Sin embargo, no eran eficaces en el tratamiento de las enfermedades (Mensa *et al.*, 2003)

En 1928, el bacteriólogo británico Alexander Fleming, descubrió la penicilina, y encontró una sustancia llamada lisozima en secreciones corporales como las lágrimas o el sudor. Tras su purificación en Inglaterra por Florey se pudo aislar y demostrar que en la porción correcta tenía la capacidad de presentar actividad antimicrobiana, principalmente frente a bacterias no patógenas (Abraham y Chain,

1940). La penicilina, el arquetipo de los antibióticos, es un derivado del hongo *Penicillium notatum*, que demostró su eficacia frente a cultivos de laboratorio de algunas bacterias patógenas como las de la gonorrea, o algunas bacterias responsables de meningitis o septicemia. Este descubrimiento permitió el desarrollo de posteriores compuestos antibacterianos producidos por organismos vivos. Otro dato importante es que Florey y Chain, en 1940, fueron los primeros en utilizar la penicilina en seres humanos, las pruebas iniciales fueron infructuosas debido a las cantidades insuficientes del hongo; los pacientes mejoraban pero fallecían al no poder completar el tratamiento (Ledermann, 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

La farmacovigilancia es una actividad dirigida a la detección y estudio de reacciones adversas a medicamentos una vez que el medicamento se comercializa tras la correspondiente autorización. Las compañías farmacéuticas han optado por la creación de nuevos medicamentos como una estrategia para combatir la resistencia de antibióticos y generar alternativas más eficaces de tratamiento (Real Decreto, 1995; Comisión Europea, 2001; Waller, 1998; Keck e Ibrahim, 2001; Waller y Evans, 2003). Por ello, la importancia de establecer un buen sistema de farmacovigilancia que ayude a la detección de reacciones adversas inducidas por los productos veterinarios una vez que se comercializan, contribuyen a su uso seguro. Con fundamento en lo mencionado este trabajo tiene como objetivo realizar estudios de seguridad y tolerancia de tres diferentes formulaciones de un antibiótico macrólido en desarrollo, cuyo blanco serán las enfermedades respiratorias de los bovinos.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar y comparar la tolerancia y seguridad clínica de un antibiótico macrólido aplicado por vía subcutánea en la tabla del cuello en ganado bovino de carne.

3.2. Objetivos Específicos

Comparar la tolerancia del antibiótico macrólido en el sitio de aplicación contemplando el grado de inflamación a diferentes días post-inoculación.

Valorar las alteraciones fisiológicas contemplando los parámetros de frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura, consumo de alimento y ganancia de peso, a diferentes días post inoculación.

IV. HIPÓTESIS

La aplicación de macrólidos en bovino de carne ejerce su efecto antibiótico sin alterar las condiciones fisiológicas ni provocar efectos secundarios adversos.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Origen de los macrólidos

Los macrólidos son producto metabólico de una cepa de *Streptomyces erythreus* obtenida en una muestra de suelo recogida en el archipiélago filipino. Más de 3 décadas después, y a pesar de no tener un efecto tan amplio como los betalactámicos, las quinolonas o los aminoglucósidos, la incorporación de nuevos compuestos a la familia, hace que se consideren de elección contra algunos microorganismos y como primera opción frente a otros (Giner *et al.*, 1995; Goodman y Gilman, 1996).

Los antibióticos del grupo Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B constituyen la superfamilia MLS (Figura 1). Como grupo, se caracterizan por inhibir la síntesis proteica en bacterias debido a su acción sobre la subunidad ribosomal (Weisblum, 2000).

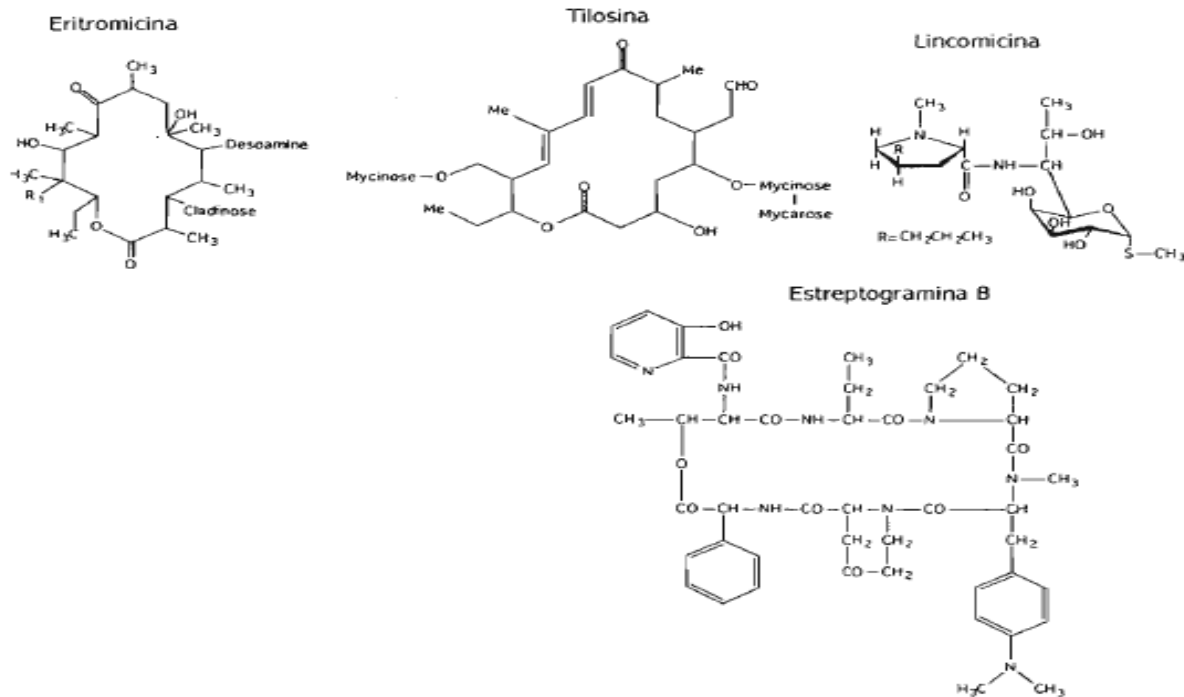


Figura 1. Antibióticos de la familia de macrólidos (Weisblum, 2000).

5.2. Estructura química

Tras el descubrimiento de la eritromicina y otros compuestos naturales, incluyendo oleandomicina, espiramicina, josamicina, mucha de la investigación ha sido dedicada a la síntesis de derivados con una mejor estructura química y biológica incluyendo sus propiedades farmacocinéticas. Estos nuevos macrólidos son moléculas semisintéticas que difieren de los compuestos originales en su patrón de sustitución de la lactona. La estructura química de los macrólidos se caracteriza por una gran lactona (Mazzei *et al.* 1993).

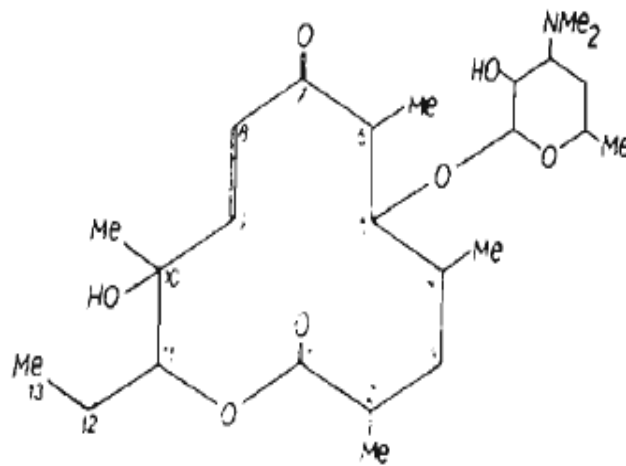


Figura 2. Estructura química del primer macrólido: picromicina (Giner *et al.*, 1995).

Su denominación como macrólidos proviene de su estructura, un anillo de lactosa macrocíclico, al que se van a unir uno o más desoxiazúcares. La sustitución del azúcar neutro (cladinosa) en posición 3 de los macrólidos con anillo de 14 átomos, por un grupo cetónico, ha dado origen a una nueva familia de antimicrobianos denominados cetólidos, cuyo único representante es la telitromicina (Gottlieb y Shaw, 1967; González-Piñera *et al.*, 1998; Alanís-Reyes, 2007).

Los macrólidos se caracterizan por su poca solubilidad en agua, tienen aspecto cristalino color blanco y son bases que se inactivan en medio ácido de ahí que se presenten en forma de sales o ésteres que son más resistentes a los ácidos, así como en sus presentaciones orales tengan una cubierta entérica para protegerlos

de la acción de los ácidos a nivel del estómago (González-Piñera et al., 1998). Los antibióticos macrólidos son sustancias cristalinas incoloras. Aunque son poco hidrosolubles, se disuelven en solventes orgánicos más polarizados. Los macrólidos con frecuencia son activados en ambientes básicos (pH >10) (Zhanel et al., 2002).

Los macrólidos poseen efecto post antibiótico, es decir que su actividad antibacteriana persiste aún después de que las concentraciones hayan descendido por debajo de la concentración inhibitoria mínima. Son mucho más eficaces contra bacterias Gram positivas que contra Gram negativas. También son activos contra mycoplasma y algunas riquetsias (Carbon, 1998).

5.3. Clasificación

Por su estructura química, los macrólidos son divididos en cuatro grupos principales: macrólidos de 14 átomos, de 15 átomos (azálidos), de 16 átomos y los estólidos.

Cuadro 1. Clasificación tradicional de macrólidos (Rivas, 2005)

14 carbonos	15 carbonos	16 carbonos
Eritromicina	Azitromicina*	Espiramicina
Oleandomicina		Josamicina
Roxitromicina*		Miocamicina
Fluritromicina*		Rokitamicina
Claritromicina*		Tilosina
Diritromicina*		

*Semisintéticos

Desde el surgimiento de la eritromicina (la cual ha sido químicamente modificada para generar más antibióticos de este tipo), los macrólidos han evolucionado en

cuatro generaciones químicas y por lo tanto se pueden clasificar también con base a este criterio. Estos cambios tienen como propósito mejorar las propiedades químicas, farmacocinéticas y terapéuticas de los macrólidos (Douthwaite *et al.*, 2000; Mensa *et al.*, 2003).

Clasificación de macrólidos (Weisblum, 2000)

1ª Generación: Incluye a los macrólidos con anillo de 14 átomos. Se genera la megalomicina y la oleandomicina. Sin embargo, estos no llegaron a ser tan efectivos como la eritromicina. Poco después de la introducción de la eritromicina a la práctica clínica se reportaron casos de resistencia denominada Resistencia Inducible a Macrólidos, Lincosamidas, Estreptogramina B (iMLS), en cepas de *Staphylococcus aureus*.

2ª Generación: Incluye a los macrólidos con anillo de 16 átomos y el surgimiento de resistencia denominada Resistencia Constitutiva a Macrólidos, Lincomicina, Estreptogramina-B (cMLS). Aparentemente las cepas inducibles de *Staphylococcus aureus* generaron una alta resistencia a macrólidos de 14 y 16 miembros así como a Lincosamidas y Estreptogramina B.

3ª Generación: Incluye macrólidos de amplio espectro con anillo de 14 y 15 átomos, utilizados contra *Mycobacterium spp.* y *Helicobacter pylori*, son semisintéticos y ácido-estables. Sin embargo, no tienen ninguna ventaja sobre la eritromicina contra cepas resistentes. El final de esta generación inicia con el surgimiento de resistencia inducible en cepas de *Mycobacterium spp.* y *Helicobacter pylori*.

4ª Generación: Incluye a los cetólidos, los cuales son macrólidos con anillo de 14 átomos que no inducen resistencia a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B (MLS). Los cetólidos con anillo de 14 átomos, han sido desarrollados recientemente. Estos son efectivos contra cepas que presentan resistencia

inducible y constitutiva. Son efectivos tanto para el género *Staphylococcus* como *Streptococcus* y *Enterococcus*.

5.4. Mecanismo de acción de los antibióticos macrólidos

Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica ligándose de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S (Aleksun, 2005). La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARN ribosómico 50S, en tanto que los macrólidos de 16 átomos actúan en la fase del ensamblaje de los aminoácidos, previa a la acción de los de 14 átomos (Kataja *et al.*, 1999).

Son bactericidas según el microorganismo, la fase de crecimiento, el inóculo, el pH del medio y la concentración del antibiótico. Se plantea la posibilidad de que la eritromicina no inhibe la formación de la cadena polipeptídica así como interfiere la acción del cloranfenicol, ya que actúa en el mismo sitio. La afinidad de la telitromicina por el ribosoma es 10 veces mayor que la de la eritromicina y seis veces superior a la de la Claritromicina. Tanto los macrólidos como los cetólidos bloquean el orificio de entrada al canal por donde sale la proteína del ribosoma (González-Piñera *et al.*, 1998; Chambers, 2003). Los macrólidos son agentes bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica de los microorganismos sensibles al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (Douthwaite *et al.*, 2000).

Debido a su mecanismo de acción e inhibición de la síntesis proteica, los macrólidos tienen efecto inmunomodulador ya que impiden la producción de toxinas bacterianas así como la formación de biofilm por parte de las pseudomonas. Los macrólidos penetran en el interior de las células fagocíticas concentrándose en los lisosomas, lo que constituye una cualidad muy importante,

ya que de esta forma se justifica su eficacia en el tratamiento de las infecciones producidas por algunos microorganismos intracelulares (Carbon, 1998).

La entrada de los macrólidos en la célula bacteriana se produce por difusión pasiva, haciéndolo a mayor velocidad en su forma no ionizada para la cual la membrana celular es más permeable; esta característica explica el incremento de la actividad observada a pH alcalino. Estos antibacterianos, considerados primariamente bacteriostáticos, también pueden comportarse como bactericidas, dependiendo del microorganismo, de las concentraciones del antibiótico y del tiempo de exposición. Su efecto bactericida puede estar en relación con alteraciones de la pared celular provocadas por la desregulación de la síntesis proteica o la acumulación tóxica de aminoacil-ARN que induce la activación de autolisinas. Todos los fármacos de esta familia producen un efecto post-antibiótico prolongado (Escolar *et al.*, 1998; Portillo, 2003).

5.5. Espectro de acción

Su espectro de acción es similar al de la penicilina, pero estos son activos, también, contra la *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y algunas riquetsias y clamidias. Se destruye por los ácidos gástricos y por eso se formula en forma de tabletas con revestimiento entérico o en sales de ésteres, como estearato, etilsuccinato o estolato, que la hacen más estable, pero también más cara. Además, sus sales de lactobionato o gluceptato se pueden administrar por vía intravenosa. Se usa como sustituto de la penicilina en muchas infecciones, especialmente alérgico a ésta, como son las infecciones por estreptococos (Cué y Morejón, 1998).

Cuadro 2. Espectro de Acción de los macrólidos (Zhanel *et al.*, 2002).

Microorganismos Gram+	Microorganismos Gram-	Microorganismos de crecimiento intracelular o yuxtacelular	Algunos protozoos
Cocos (excepto estafilococos resistentes a meticilina y <i>enterococcus</i> spp.) como bacilos <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Listeria</i> , <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Pediococcus</i>	<i>Moraxella</i> spp., <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus ducreyi</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia</i> spp., <i>Legionella</i> spp., <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Coxiella burnetii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Cryptosporidium</i> y <i>Plasmodium</i>). La mayoría de bacilos gramnegativos (BGN), incluyendo algunos microorganismos anaerobios <i>Bacteroides</i> spp. Y <i>Fusobacterium</i> spp.

5.6. Uso de macrólidos en humanos

Los agentes antimicrobiano macrólidos del grupo azalida (Bright *et al.*, 1988) difieren estructuralmente de otros macrólidos por la inserción de un átomo de nitrógeno sustituido con metilo en la novena posición en el anillo de lactona (Retsema *et al.*, 1987). Tiene amplio espectro que incluye bacterias Gram positivas y algunas bacterias Gram negativas en los seres humanos, debido a una eliminación prolongada se han determinado altas concentraciones en plasma, por lo tanto, el intervalo de administración es más amplio en comparación con la de los macrólidos de uso común, tales como la eritromicina o claritromicina (Zhanel *et al.*, 2002). El uso de macrólidos de 15 átomos en humanos, abarca una gran variedad de padecimientos infecciosos, incluyendo infecciones respiratorias, genitales y por toxoplasmosis entre otras como *Legionella*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, y algunas especies de *Mycobacterium*. En la práctica clínica, los macrólidos se utilizan en el

tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias. Debido a su espectro antibacteriano y a las capacidades inmunomoduladoras, una buena penetración tisular y la capacidad para la acción intracelular son de gran importancia así como la amplia eficacia contra muchos organismos que afecta a los pulmones (Garry *et al.*, 2000; Shinkai *et al.*, 2008).

Cuadro 3. Vías de administración reportadas en la literatura para macrólidos (Anadón y Reeve-Johnson, 1999).

Fármaco	Animal	DOSIS (mgkg⁻¹)
Eritromicina Baggot y Gingerich (1976) Burrows <i>et al.</i> , (1989)	Bovino	12.5 i.v. 15 i.m. 15 i.m
Tilmicosina Ziv <i>et al.</i> , (1995)	Bovino	10 s.c. 10 i.v.
Tilosina Baggot y Gingerich (1976) Gingerich <i>et al.</i> , (1977) Weisel <i>et al.</i> , (1977)	Bovino Bovino Canino	12.5 i.v. 12.5 i.m. 10 i.m. 10 i.v.
Espiramicina Sanders <i>et al.</i> , (1992) Cester <i>et al.</i> , (1990)	Bovino Ovino	9.37 i.m 9.37 s.c 9.37 i.m. 20 i.m

Desde que los macrólidos se empezaron a utilizar en la década de 1970 en el tratamiento del asma y tras los sobresalientes resultados obtenidos en los pacientes afectados de panbronquiolitis difusa (Kudohs y Yamamoto, 1998). Su uso como tratamiento antiinflamatorio se extendió a otras enfermedades respiratorias, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la bronquiectasia y al síndrome de bronquiolitis obliterante (Spector y Katz, 1974).

5.7. Uso de macrólidos en medicina veterinaria

La medicina veterinaria requiere estudios sobre el potencial de los macrólidos y sus efectos en las especies, incluyendo el establecimiento de las dosis óptimas y posibles interacciones con otros medicamentos. Los antibióticos macrólidos han demostrado ser valiosas alternativas para las penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos para el tratamiento de infecciones en medicina veterinaria, principalmente en enfermedades respiratorias crónicas en porcinos, ovejas y ganado vacuno. Además de ser auxiliar en el tratamiento de mastitis clínica y subclínica en vacas lecheras (Anadón y Reeve-Johnson, 1999).

El mecanismo antimicrobiano es el mismo para todos los miembros del grupo. Interfieren con toda síntesis proteica al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma. Parecen unirse al lugar del donador, impidiendo así la translocación necesaria para el alargamiento de la cadena peptídica. Los macrólidos son activos frente a la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias Gram positivas, aunque hay variaciones considerables con respecto a su potencia y actividad (Kataja *et al.*, 1999; Weisblum, 2000).

Los macrólidos se absorben muy bien por vía oral, aunque se suelen aplicar por otras vías intramuscular, intravenosa, nasal, intraocular, etc. Una vez que se absorben se distribuyen muy bien por los tejidos y líquidos corporales, con excepción del líquido céfaloraquídeo y el cerebro; en algunos casos presentan vida media prolongada en particular la azitromicina, roxitromicina, tilmicosina y espiramicina. Esta última tiende a acumularse en tejidos infectados, lo que aumenta su eficacia con cada dosis, aunque obviamente aumenta su residualidad (Sumano y Ocampo, 2006).

Su estructura química contiene un anillo de lactona macrocíclica a la cual se adhieren azúcares. Pueden sustituir a la penicilina G. Este grupo incluye oleandomicina, troleandomicina, eritromicina y otros antibióticos. El espectro y la

actividad antibacteriana de este grupo es similar al de las penicilinas, y se pueden utilizar en infecciones por microorganismos resistentes a ellas (Fuentes, 1992).

5.7.1. Macrólidos más utilizados en medicina veterinaria.

Eritromicina: Es producida por *Streptomyces erythreus*, según la naturaleza del microorganismo y la concentración del antibiótico, puede ser bactericida o bacteriostática su actividad es similar a la de la benzilpenicilina, efectiva contra cocos Gram positivos sensibles a la penicilina G procaínica. Se absorbe en la parte inicial del intestino y se difunde a tejidos, por vía oral. Por vía intramuscular se puede distribuir en semen, líquido prostático y vesical, se difunde a peritoneo, pleura y placenta en concentraciones terapéuticas. Su excreción se debe a su concentración en hígado y la bilis la elimina en grandes cantidades, también su eliminación urinaria es activa y constante proporcional a la administración. Sus usos e indicaciones establecen que pueden administrarse por vías intramuscular, intravenosa y oral. En aves por su solubilidad puede administrarse por vía oral resistente al pH del buche y molleja, se absorbe en intestino tiene buena absorción en huevo haciendo resistente al pollito a infección por *Mycoplasma* (Fuentes, 1992).

En bovinos es preferible utilizar la eritromicina por vía intramuscular y evitar la vía gastrointestinal. Se recomienda utilizar una dosis de 2.8 a 8.8 mg/kg/día IM para el tratamiento de neumonías bacterianas y para el complejo respiratorio bovino. Para el tratamiento de pasteurelosis se recomienda una dosis de 15 mg/kg/12h. La inyección debe ser intramuscular (IM) profunda. No se debe administrar por vía intravenosa (IV) o subcutánea. En el tratamiento por mastitis representa un gran apoyo terapéutico por que se difunde a glándula mamaria en concentraciones ideales para atacar la mastitis clínica por *Staphylococcus aureus* (Fuentes, 1992; Sumano y Ocampo, 2006).

Claritromicina: La Claritromicina es un macrólido derivado de la eritromicina aprobada por la FDA como promotor del crecimiento, se considera que tiene capacidad inmunoestimulante. Se une a la subunidad 50S, con lo que inhibe la síntesis proteica bacteriana, es resistente a medios ácidos; logra entrar en leucocitos y macrófagos produciendo un efecto inmunoestimulante, permanece en tejido pulmonar en amplias concentraciones y se elimina por orina y heces. Su indicación establece una dosis de 10 mg/kg/día en caninos para infecciones por bacterias Gram positivas y *Mycoplasma* (Sumano y Ocampo, 2006).

Azitromicina: La Azitromicina es un macrólido con 15 átomos y es usado principalmente en medicina humana; tiene algunas ventajas en el tratamiento en infecciones en animales incluyendo una mejor absorción cuando se administra por vía oral, ya que tiene una vida media prolongada y amplio espectro. Se concentra en citoplasma de las células fagocíticas, y así permite llegar al sitio de infección, siendo la concentración superior a la plasmática y así le permite llegar al sitio de infección. Aunado al efecto bacteriostático y bactericida tienen un efecto antiinflamatorio al reducir la liberación de citosinas. Sus usos establecen su eficacia en aves al suministrar vía oral en agua o alimento, alcanza su valor tisular en relación proporcional a la dosis (Sumano y Ocampo, 2006).

Tilosina: La Tilosina es un macrólido de 16 átomos de carbono. La tilosina base es poco hidrosoluble pero se disuelve con facilidad en solventes orgánicos para producir sales como el tartrato y el fosfato. La tilosina es activa contra bacterias Gram positivas y *Mycoplasma* principalmente, el tartrato de tilosina se absorbe en tracto digestivo de aves y cerdos, su aplicación es subcutánea y también puede suministrarse en el agua de bebida. En vacas y terneras la tilosina aplicada intramuscular es empleada contra gabarro, neumonías y metritis. En perros y gatos se aplica tilosina vía intramuscular en infecciones respiratorias de las vías altas, otitis externa, metritis, leptospirosis e infecciones secundarias de tratamiento posoperatorio. El uso alternativo de antibióticos de 15 átomos podría ser una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan al ganado

bovino por ser un medicamento de eliminación prolongada y amplio espectro (Fuentes, 1992; Sumano y Ocampo, 2006).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el rancho experimental “El Astillero” (Laboratorios Virbac México. Departamento de Investigación y Desarrollo en Latinoamérica), ubicado en el km 43, Carretera Jiquilpan, Michoacán, Acatlán de Juárez, Jalisco, México. El rancho tiene una temperatura promedio anual de 20.5 °C, con una máxima de 29 °C y una mínima de 18 °C, una humedad relativa de 70%. Cuenta con 3 corrales grupales con piso firme y 3 con piso de tierra. También, hay 12 corrales individuales de 16 m², manga de manejo, prensa ganadera y báscula electrónica (Tecnocor, modelo: IPEN 2000) con certificado de calibración vigente.

6.1. Unidad experimental

Se trabajó con bovinos como especie blanco para la utilización de antibióticos de amplio espectro, indicado para el tratamiento de enfermedades respiratorias causadas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* y *Mycoplasma bovis*. Se consideró a cada bovino como unidad experimental, los ejemplares fueron cruce de *Bos taurus/Bos indicus*.

Cuadro 4. Condiciones de tratamiento aplicado a cada grupo.

Grupos		Aplicación	Dosis única	Tratamiento
Grupo 1	3 machos	Tabla del cuello	15 mL Vía subcutánea	LE14045-A
	3 hembras			LE14045-A placebo
Grupo 2	3 machos			LE14045-F
	3 hembras			LE14045-F placebo
Grupo 3	3 machos			LE14045-K
	3 hembras			LE14045-K placebo

6.2. Tratamientos

Grupo 1: Formulación LE14045-A lado derecho y vehículo LE14045-A lado izquierdo.

Grupo 2: Formulación LE14045-F lado derecho y vehículo LE14045-F lado izquierdo.

Grupo 3: Formulación LE14045-K lado derecho y vehículo LE14045-A lado izquierdo.

6.3. Selección de animales

La asignación de los bovinos a los diferentes grupos fue basada en una tabla de números aleatorios. De esta manera, todos tuvieron la misma probabilidad de ser seleccionados a cualquiera de los tratamientos. Los 18 bovinos utilizados en este estudio fueron originarios de Huejotitan y Atoyac, Jalisco, México. Fueron identificados mediante aretes plásticos de colores y numerados.

6.4 Manejo de los animales

Los animales recibieron un periodo de adaptación de una semana en las instalaciones del rancho, en este periodo se les dio un manejo especial con el objetivo de acostumbrarlos a comer y beber en corrales acondicionados para los fines del estudio para evitar condiciones de estrés.

Se alojaron en corrales techados para proporcionar sombra donde tuvieron un espacio de 9 m² (3.20 m de largo por 2.80 m de ancho) por animal y 0.8 m lineales de comedero, y 1 m de bebedero. Se ubicó un higrotermómetro en el área de corrales, donde se alojaron. Se llevó un registro de la temperatura máxima y mínima además de la humedad relativa. La lectura de temperatura, se realizó entre las 7:00 y 8:00 h. La lectura de humedad relativa se llevó a cabo siempre a las 7:00 h y a las 14:00 h.

Las instalaciones tenían manga de manejo, prensa ganadera, báscula electrónica y área de corrales individuales.

Los bovinos fueron desparasitados antes del inicio del estudio. Se evitó cualquier medicación inyectable que pudiera afectar la respuesta del producto de prueba. También fueron evaluados clínicamente y se corroboró que estuvieran sanos con buena condición corporal. Además fueron familiarizados con el manejo e instalaciones, además alimentados con una dieta acorde a la etapa fisiológica (200-350 kg de peso vivo).

Los animales en estudio se removieron en los siguientes casos: 1) Incapacidad para valorar los procedimientos del estudio; 2) Condición fisiológica o patológica que impidiera el desarrollo del estudio; 3) Por alguna reacción adversa grave, lesión o enfermedad; 4) Por muerte o sacrificio. La remoción, sus causas y justificación se registraron.

Todos los animales se sujetaron a un horario de alimentación estricto y con acciones trazables, en donde se registraron datos como: cantidad de alimento proporcionado, consumos y alimento rechazado de manera individual en cada uno de los animales, todo ello con la finalidad de vigilar los consumos en la duración del estudio. Se consideraron 200 a 350 kg de peso en promedio, con una ganancia de peso de 0.272 kg/día. Se les administró 6.9 kg de materia seca, 4.57 Mcal/día de energía neta de ganancia y 272 g/día de proteína metabolizable.

La alimentación fue a base de rastrojo con maíz más alimento balanceado comercial. El consumo de alimento y agua fueron registradas por día de experimentación.

El alimento fue proporcionado diariamente a las 7:00 h, previamente pesado en una báscula de tipo mini con lector digital, capacidad de 60 kg. Los animales entraron a comer de 7:30 a 10:30 h y de 15:00 a 20:00 h., tiempo en que

permanecieron encerrados de manera individual; una vez terminado el tiempo de consumo, se abrieron las puertas, para que los animales se desplazaran al corral grupal respectivo, y así, interactuar con los demás animales asignados a dicho corral grupal; mientras esto sucedía, su corral permaneció cerrado, para no alterar la cantidad de alimento que contenía cada comedero. La misma acción se realizó para el alimento vespertino a las 14:00 h.

Cada comedero se identificó con una etiqueta que portó el número del animal, misma pauta para todos los animales en cada uno de sus comederos. De esta manera, se aseguró, que el animal consumiera el alimento diario correspondiente llevándose un registro preciso individual de la alimentación.

El alimento siempre se proporcionó por la mañana, la cantidad de alimento fue con base en el consumo observado el día anterior, siempre procurando que hubiera alguna cantidad rechazada, esto es, que cada animal saciara su apetito por completo. Para el alimento vespertino de alimento, cualquier porción restante de la alimentación matutina se mezcló con el alimento de la tarde; para, el día siguiente, se pesó el alimento sobrante (alimento de rechazo). Las mediciones de rechazo de alimento se realizaron entre las 7:00 y 7:30 h.

6.5 Descripción, Posología y vía de administración de los productos en investigación

Solución antibiótica inyectable al 20%, contenida en un frasco de vidrio de 50 mL. Solución inyectable constituida solo por vehículo. No se necesitó preparación ya que el producto se encuentra listo para aplicarse. Se aplicaron 15 mL por animal, lo cual representó un total de 3 g. La aplicación fue por vía subcutánea en la zona de la tabla del cuello.

La dosis utilizada es la máxima empleada bajo condiciones experimentales (el estudio es considerado exploratorio preliminar), con la justificación en base de las

observaciones de seguridad y tolerancia, para establecer una dosis para el producto macrólido comparado con el placebo. La dosis del placebo constó del mismo volumen de 15 mL, para tener el parámetro de evaluación y la tolerancia.

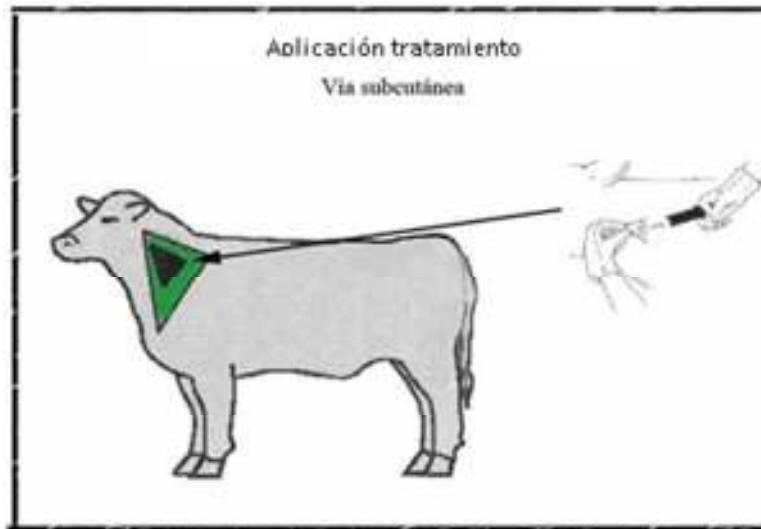


Figura 3. Zona de aplicación del fármaco en evaluación.

6.6 Metodología para la aplicación de los productos en investigación

El animal se inmovilizó por medio de una trampa ganadera, posteriormente se esquiló y se realizó asepsia en la tabla del cuello (ambos lados), con una torunda humedecida en alcohol, el sitio ideal para la aplicación de los productos fue en la mitad anterior del cuello en un punto equidistante del límite superior e inferior del cuello.

Para la correcta aplicación por vía subcutánea, la aguja se colocó en posición oblicua al pliegue de la piel, asegurándose de no traspasar, y se realizó la punción y aplicación del producto. Para evitar la administración del producto en sangre, se realizó presión negativa en la jeringa (se jaló el émbolo hacia atrás) y se aseguró de no estar en comunicación con el torrente sanguíneo.

Cuadro 5. Régimen de tratamientos.

Grupo	No. de animales	Tratamiento	Zona de aplicación cuello	Vía	Régimen	Dosis por animal
1	3 hembras 3 machos	LE14045-A	Derecho	Subcutánea	única	15 mL
		LE14045-A placebo	Izquierdo			
2	3 hembras 3 machos	LE14045-F	Derecho			
		LE14045-F placebo	Izquierdo			
3	3 hembras 3 machos	LE14045-K	Derecho			
		LE14045-K placebo	Izquierdo			

6.7 Variables a evaluar

6.7.1 Revisión clínica del sitio de aplicación (tolerancia local)

Se realizaron revisiones al sitio de aplicación, en los días 1, 3, 7 y 14, con el fin de detectar cualquier efecto ocasionado por el producto aplicado, las exámenes clínicos se realizaron a todos los animales incluidos en el estudio y fueron 1) Frecuencia y ritmo cardiaco, 2) Frecuencia respiratoria, 3) Temperatura corporal, 4) Aspecto y color de las mucosas, 5) Cambios en el comportamiento del animal (sección de comentarios en los formatos). Los parámetros que se tomaron en cuenta se observan en el cuadro 7.

Cuadro 6. Parámetros clínicos evaluados en los animales de estudio.

Parámetros		
Dolor	Si	no
Rubor	Si	no
Tumefacción	Si	no
Largo	Vertical	mm
Ancho	horizontal	mm
Profundidad	----	mm

Además de lo anterior, se complementó la revisión clínica con estudios de hemograma y química sanguínea en todos los animales incluidos en el estudio, con la finalidad de ver el estado de salud.

6.8 Diseño experimental

La presente investigación es un estudio clínico comparativo, controlado, prospectivo, aleatorio en una sola fase con 4 semanas de duración, se utilizaron 18 animales distribuidos en 3 grupos con 6 animales (3 machos y 3 hembras) cada uno. En el estudio se aplicaron tres tratamientos, cada uno de ellos, consistió en una aplicación de una formulación del producto macrólido. No hubo un grupo de animales testigo, esto se debió a que cada animal fue su propio testigo negativo, ya que cada animal se inoculó con la formulación del macrolido en las tablas del cuello de lado derecho y al mismo tiempo se inoculó el vehículo de la formulación en el lado izquierdo del cuello.

6.9 Descripción de la metodología estadística

6.9.1 Determinación del tamaño de la muestra

Se eligió el tamaño de muestra con base en las recomendaciones sobre el diseño de estudios de seguridad en especies blanco (Comisión Europea, 2001).

Al obtener los resultados del estudio, se determinó la potencia del mismo, en relación a las diferencias encontradas en los parámetros más importantes.

6.9.2 Verificación de la adecuada asignación aleatoria

Se revisaron, mediante estadística descriptiva, los promedios y desviaciones estándar de los datos de sexo y peso corporal, entre los grupos de tratamiento, con el fin de que fueran razonablemente similares.

6.10 Análisis de las variables

6.10.1 Datos de tolerancia local

Se recopilaron y ordenaron los datos de tolerancia generados a lo largo del estudio, para posteriormente realizar una estadística descriptiva. Después de obtener el área (cm²) de la lesión por multiplicación de los cm de largo y ancho, estos valores se sometieron a un análisis mediante el programa estadístico GraphPad Prisma 5.0 y se elaboró un análisis de varianza ANOVA considerando una diferencia significativa como ($P < 0.05$).

6.10.2 Registros de consumo de alimento y ganancia de peso

Los datos de consumo de alimento, de los animales en prueba, se ordenaron y se analizaron mediante estadística descriptiva; posteriormente se aplicó un análisis de varianza (bloques al azar). En caso de que no se cumplieran los supuestos de las pruebas paramétricas, se aplicaron alternativas no paramétricas que se describen en el reporte final del estudio.

6.11 Manejo de datos y registros

Se coleccionaron todos los datos brutos y quedaron archivados, y retenidos de acuerdo a las Buenas Prácticas Clínicas y a los requisitos de regulación aplicables.

6.12 Eventos adversos y su relación con el fármaco

6.12.1 Identificación y categorización de los eventos adversos

Para cada animal se observaron señales o signos de eventos adversos relacionados con el fármaco macrólido durante el desarrollo del estudio. Se vigiló con el fin de registrar mediante una revisión clínica algún efecto adverso.

Se documentó y describió la reacción, y la severidad de los efectos y se trató de explicar su hipótesis sobre el producto en base a los siguientes parámetros descritos.

6.12.2 Severidad de eventos adversos durante el estudio

- | | |
|-------------|---|
| 1. Leve | Pequeña o ninguna incomodidad.
Signos intermitentes o continuos.
Observación de las funciones no entorpecidas.
No arriesga significativamente la salud.
Terapia y/o procedimiento clínico no necesario. |
| 2. Moderado | Un poco de incomodidad.
Signos intermitentes o continuos.
Funciones moderadamente entorpecidas.
No arriesga significativamente la salud.
Terapia y/o procedimiento clínico puede ser necesario. |
| 3. Severo | Incomodidad severa.
Signos continuos.
Funciones severamente entorpecidas.
Significativamente arriesga la salud.
Terapia y/o procedimiento clínico indispensable. |

6.12.3 Relación de los eventos adversos con el fármaco en prueba

1. Desconocido: Sin relación con el tratamiento administrado
2. No relacionado: Claramente preexistente o causado por un evento específico extraño, sin otro factor causal evidente.

3. Posible: Posible asociación con el fármaco, por razones de: tipo, tiempo y curso de presentación; puede seguir un modelo de respuesta por el medicamento administrado, pero también es posible que se produjo por el estado clínico del animal.

4. Probable: Posible asociación con el fármaco, por razones de: tipo, tiempo y curso de presentación; sigue un modelo de respuesta por el medicamento administrado (incluye dosis excesiva), no se relaciona con otra terapia.

6.12.4 Procedimientos de diagnóstico en relación al evento adverso

Se tendría que determinar la necesidad de realizar análisis paraclínicos o pruebas complementarias o pruebas especiales.

6.12.5 Procedimientos de terapéuticos en relación al evento adverso

Se tendría que determinar la necesidad de aplicar algún tratamiento complementario, particularmente en el evento de una reacción grave, de frecuencia rara o muerte, aun cuando el evento no parezca estar relacionado con el producto en prueba.

6.13 Evaluación, seguridad y consumo

6.13.1 Evaluación de tolerancia y seguridad

A todos los animales bajo estudio les fue realizado un examen físico-clínico en el sitio de aplicación de los diferentes productos a diferentes tiempos. Con la finalidad de determinar la severidad de la inflamación se realizaron mediciones por medio de un Vernier y los resultados fueron reportados en milímetros (mm). Para determinar la seguridad de la aplicación del elemento de prueba también fueron contemplados parámetros como: dolor a la palpación, presencia o ausencia de tumefacción, eritema, decoloración del pelaje, alopecia, prurito, necrosis y constantes fisiológicas como: frecuencia y ritmo cardiaco, frecuencia respiratoria, temperatura corporal, aspecto y color de las mucosas y cambios en el comportamiento del animal.

6.13.2 Estudios de hemograma y bioquímica sanguínea

A todos los animales bajo estudio se tomaron muestras de sangre, para la realización de hemograma en tubos de ensayo al alto vacío de 7 mL con EDTA y el análisis del perfil bioquímico sérico en tubos sin anticoagulante, con la finalidad de evaluar la salud de los animales.

Las muestras de sangre fueron colectadas mediante punción de la vena yugular. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 2-8 °C y fueron enviadas para su análisis al laboratorio.

6.14 Bienestar animal

Durante el desarrollo del estudio, se mantuvo una vigilancia y prácticas ganaderas adecuadas a lo largo de la evaluación y evitar estrés innecesario, esto incluyó en las fases de manejo de los animales, administración, manejo y aplicación del elemento de prueba, dieta, alojamiento y seguimiento después de la conclusión del estudio, con la finalidad de asegurar que los animales se encontraban en adecuadas condiciones de salud y bienestar.

VII. RESULTADOS

7.1 Conformación de grupos de trabajo

Los grupos de trabajo para la evaluación de seguridad y tolerancia del producto macrólido (404.06), se conformaron basados en una tabla de números aleatorios. De esta manera, todos los animales tuvieron la misma probabilidad de ser seleccionados a cualquiera de los grupos. A todos los animales se les realizaron estudios de hemograma y química sanguínea 7 días antes de iniciar el trabajo **(Cuadros 8 y 10)** y se valoraron con los parámetros de referencia **(Cuadros 7 y 19)**. También, se tomaron diferentes constantes fisiológicas con el objetivo de corroborar la salud de los animales durante la fase de experimentación animal **(Cuadro 11)**.

Los 18 animales distribuidos en los tres grupos de tratamiento mostraron parámetros dentro del rango de hemograma y constantes fisiológicas de (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura). En el caso de algunos parámetros químico sanguíneos como: colesterol, urea, fosfatasa alcalina, proteínas, albúmina, globulina, albúmina-globulina, calcio y fósforo, se observaron alteraciones en comparación a los estándares establecidos **(Cuadro 10)**.

Cuadro 7. Valores hematológicos de referencia en bovinos.

Ht	Hb	Er	VGM	CGMH	Fib	Pla	Prot.	Le	N.S	N.B.	L	M	E	B
0.24-.46 L/L	80-150 g/L	5-10 X10 ¹² /L	40-60 f/L	300-360 g/L	3-7 g/L	110-800 X10 ⁹ /L	70-85 g/L	4-12 X10 X10 ⁹ /L	0.6-4 X10 ⁹ /L	0-1.2 X10 ⁹ /L	2.5-7.5 X10 ⁹ /L	0.25-0.84 X10 ⁹ /L	0-2.4 X10 ⁹ /L	0-0.2 X10 ⁹ /L

Cuadro 8. Valores hematológicos encontrados en los animales de estudio.

Identificación	Ht	Hb	Er	VGM	CGMH	Fib	Pla	Prot.	Le	N.S	N.B.	L	M	E	B
2Am	0.28	94	6.1	46	336	4	135	52	6.3	2.8	0.0	2.8	0.4	0.3	0.0
34 Az	0.32	107	6.8	47	334	4	104	69	8.1	1.1	0.0	6.2	0.6	0.1	0.1
48 Vd	0.36	114	8.7	41	317	6	251	60	6.5	1.0	0.0	5.2	0.1	0.1	0.1
07 Bc	0.21	71	4.3	49	338	7	314	69	8.6	1.1	0.1	7.0	0.3	0.0	0.0
02 Bc	0.36	116	8.0	45	322	4	251	63	7.9	1.6	0.1	4.5	0.8	0.7	0.1
10 Bc	0.34	108	6.7	51	318	6	186	58	8.7	1.7	0.0	5.5	0.3	0.1	0.1
28 Az	0.32	103	6.9	46	322	7	238	67	7.2	1.9	0.0	4.5	0.5	0.2	0.1
17 Bc	0.33	106	6.6	50	321	6	207	68	6	1.2	0.0	4.5	0.1	0.1	0.1
99 Nar	0.36	114	8.5	42	317	8	356	70	7	1.6	0.0	4.9	0.5	0.0	0.0
05 Bc	0.31	100	7.6	41	323	5	238	64	7.3	1.8	0.0	4.4	0.4	0.6	0.1
06 Bc	0.31	105	6.0	52	339	4	396	76	11.7	5.7	0.1	5.6	0.2	0.1	0.0
03 Bc	0.31	98	7.0	44	316	5	210	56	9.1	2.3	0.0	5.8	0.3	0.7	0.0
74 Az	0.33	105	7.8	42	318	6	224	69	6.1	1.8	0.0	5.2	0.1	0.1	0.1
96 Nar	0.36	111	7.4	49	308	3	236	54	7.1	2.1	0.0	4.8	0.1	0.1	0.0
45 Vd	0.24	85	5.5	44	354	5	188	48	4.8	0.8	0.0	3.4	0.3	0.2	0.1
13 Bc	0.29	94	6.5	45	324	6	189	65	8.4	2.0	0.0	5.5	0.7	0.1	0.1
11 Bc	0.30	97	6.2	48	323	7	266	68	6.4	1.8	0.0	5.5	0.3	1.1	0.1
37 Vd	0.31	102	6.4	48	329	6	406	61	7.2	2.0	0.0	5.0	0.2	0.0	0.0
Promedio	0.31	101.6	6.8	46.1	325.5	5.5	244.1	73.1	7.4	1.9	0.01	5.0	0.34	0.25	0

Ht - Hematocrito, Hb - Hemoglobina, Er - Eritrocitos, VGM - Volumen Globular Medio, CGMH - Concentración Globular Media de Hemoglobina, Fi - Fibrinógeno, Pl - Plaquetas, Prot. - Proteínas, Le - Leucocitos, N.S - Neutrófilos Segmentados, N.B - Neutrófilos en Banda, L - linfocitos, M - Monocitos, E - Eosinófilos y B - Basófilos.

Cuadro 9. Valores de referencia de químicas sanguíneas en bovinos.

Gluc	Col	Urea	Crea	AST	FA	BIL T	BIL D	BIL I	BD/BI	PROT	ALB	GLOB	A/G	Ca	P
2.0-3.9 Mmol/L	2.2-6.6 Mmol/L	0.9-3.6 Mmol/L	88.4-177 Umol/L	48-100 U/L	68-320 U/L	1.7-11.7 Umol/L	0.68-2.56 Umol/L	0-6.84 Umol/L	- calculado	59-81 g/L	29-39 g/L	25-47 g/L	0.6-1.3 calculado	2.10-2.67 mmol/L	1.32-2.65 mmol/L

Cuadro 10. Valores de químicas sanguíneas encontrados en los animales de estudio.

Identificación	Gluc	Col	Urea	Crea	AST	FA	BIL T	BIL D	BIL I	BD/BI	PROT	ALB	GLOB	A/G	Ca	P
2Am	2.12	0.84	0.33	157	53	106	4.5	1.2	3.30	0.4	49	30.0	19.0	1.58	2.41	3.04
34 Az	3.74	1.98	1.67	146	53	70	6.9	2.3	4.6	0.5	64	36.0	28.0	1.29	2.44	1.46
48 Vd	3.29	2.41	0.81	125	81	758	6.4	1.15	5.3	0.2	53	35.0	18	1.94	2.73	2.90
07 Bc	2.93	2.25	0.50	114	70	144	2.4	0.02	0.4	5.3	61	31.0	30.0	1.03	2.46	2.80
02 Bc	3.29	2.82	1.90	1.32	64	640	3.8	1.7	2.1	0.8	58	36	22.0	1.64	2.44	1.32
10 Bc	3.38	1.97	0.51	125	56	23	1.84	0.9	0.9	1.0	52	22.0	30.0	0.73	2.05	0.78
28 Az	2.88	2.66	0.54	135	22	394	4.5	2.1	2.4	0.9	59	34.0	25.0	1.36	2.48	2.72
17 Bc	4.52	2.14	0.49	144	54	246	2.4	1.7	0.7	2.4	62	32.0	30.0	1.07	2.51	2.94
99 Nar	3.73	2.34	0.33	143	62	584	1.96	1.15	0.8	1.4	62	32.0	30.0	1.07	3.32	1.32
05 Bc	3.78	2.84	0.35	99	70	131	4.1	2.05	2.1	1.0	59	34	25	1.36	2.57	1.60
06 Bc	3.40	2.72	1.55	89	293	366	5.6	1.96	3.6	0.5	70	42.0	28.0	1.50	2.67	2.83
03 Bc	1.24	1.35	1.12	97	67	414	0.94	0.7	0.2	2.9	50	31.0	19.0	1.63	2.89	2.75
74 Az	4.15	2.52	0.60	153	562	114	6.2	2.41	3.8	0.6	62	36.0	26.0	1.38	2.27	1.65
96 Nar	3.11	2.33	0.75	146	76	761	4.3	1.3	3.0	0.4	50	36.0	14.0	2.57	1.96	2.69
45 Vd	3.73	1.84	1.56	145	87	191	8.2	2.35	5.9	0.4	43	27.0	16.0	1.69	2.67	1.42
13 Bc	3.08	3.44	1.66	78	60	77	2.3	1.4	0.9	1.6	57	34.0	23.0	1.48	2.31	2.66
11 Bc	1.69	2.03	1.16	276	28	195	1.4	0.85	0.6	1.5	61	41.0	20.0	2.05	2.57	1.34
37 Vd	3.33	2.23	0.41	110	32	106	8.4	2.15	6.3	0.3	53	37.0	16.0	2.31	2.63	3.02
Promedio	3.18	2.26	0.90	126.8	99.4	295.5	4.2	1.5	2.6	1.2	56.9	33.6	23.2	1.5	2.5	2.1

Glu - Glucosa, Col - Colesterol, Urea - Urea, Crea - Creatinina, DHL - Deshidrogenasa láctica, AST - Aspartato amino transferasa, FA - Fosfatasa alcalina, Prot. - Proteínas, Alb - Albúmina, Glob - Globulina, AG - Albumina-Globulina, Ca - Calcio, P - Fósforo, Na - Sodio, K - Potasio y Cl - Cloro.

Cuadro 11a. Constantes fisiológicas de los grupos de trabajo al inicio de la fase experimental. (Grupo 1:A).

Grupos	Sexo	Identificación	Pesos kg	FC/minuto parámetros	FR/minuto	Tm.°C
Grupo 1:A	H	2 Am	241	112	28	39.2
	H	34 Az	229	60	36	38.6
	H	48 Vd	203	76	40	39
	M	07 Bc	225	68	35	38.1
	M	02 Bc	264	76	52	38.5
	M	10 Bc	226	72	44	38.7
Promedio			231	77.3	39.1	38.6

Cuadro 11b. Constantes fisiológicas de los grupos de trabajo al inicio de la fase experimental. (Grupo 2:F).

Grupos	Sexo	Identificación	Pesos kg	FC/minuto parámetros	FR/minuto	Tm.°C
Grupo 2:F	H	28 Az	236	78	32	38.4
	H	17 Bc	221	108	40	38.9
	H	99 Nar	235	84	30	38.8
	M	05 Bc	219.5	88	52	38.4
	M	06 Bc	205	88	36	39.7
	M	03 Bc	254	96	56	38.5
Promedio			228.4	90.33	41	38.78

Cuadro 11c. Constantes fisiológicas de los grupos de trabajo al inicio de la fase experimental. (Grupo 3:K).

Grupos	Sexo	Identificación	Pesos kg	FC/minuto parámetros	FR/minuto	Tm.°C
Grupo 3:K	H	74 Az	258	104	28	39.6
	H	96 Nar	224	112	24	38.7
	H	45 Vd	209	70	36	39.2
	M	13 Bc	192	72	60	39.5
	M	11 Bc	264	84	52	38.6
	M	37 Vd	145	80	48	39
Promedio			215.33	87	41.33	39.1

kg - Kilogramos, FC - Frecuencia Cardiaca, FR - Frecuencia Respiratoria, Tm - Temperatura.

7.2 El producto macrólido en sus tres formulaciones altera constantes fisiológicas

Se pudo observar que el producto a prueba alteró 1 °C el promedio de la temperatura corporal al día 1 postratamiento observando fiebre en la mayoría de los animales independiente a las diferentes formulaciones (**Figura 4**), en cuanto al seguimiento de frecuencia respiratoria se observó una disminución considerable el día 7 postratamiento. (**Figura 5**). En la frecuencia cardiaca no se observó alteración asociada al tratamiento (**Figura 6**),

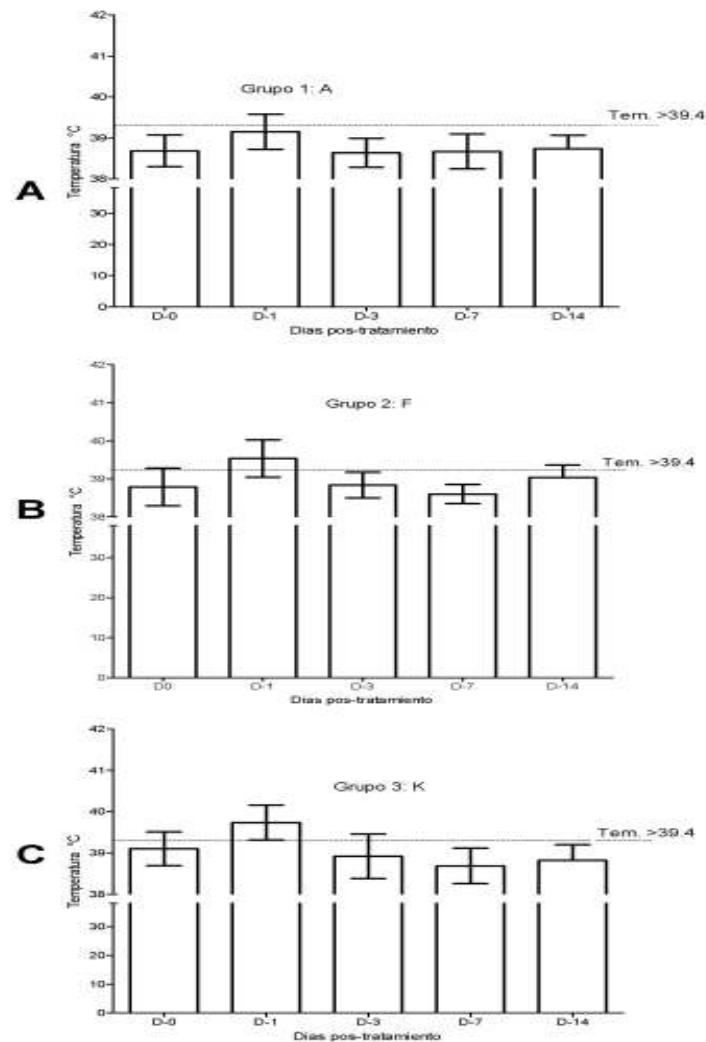


Figura 4. Temperatura corporal 14 días post tratamiento.

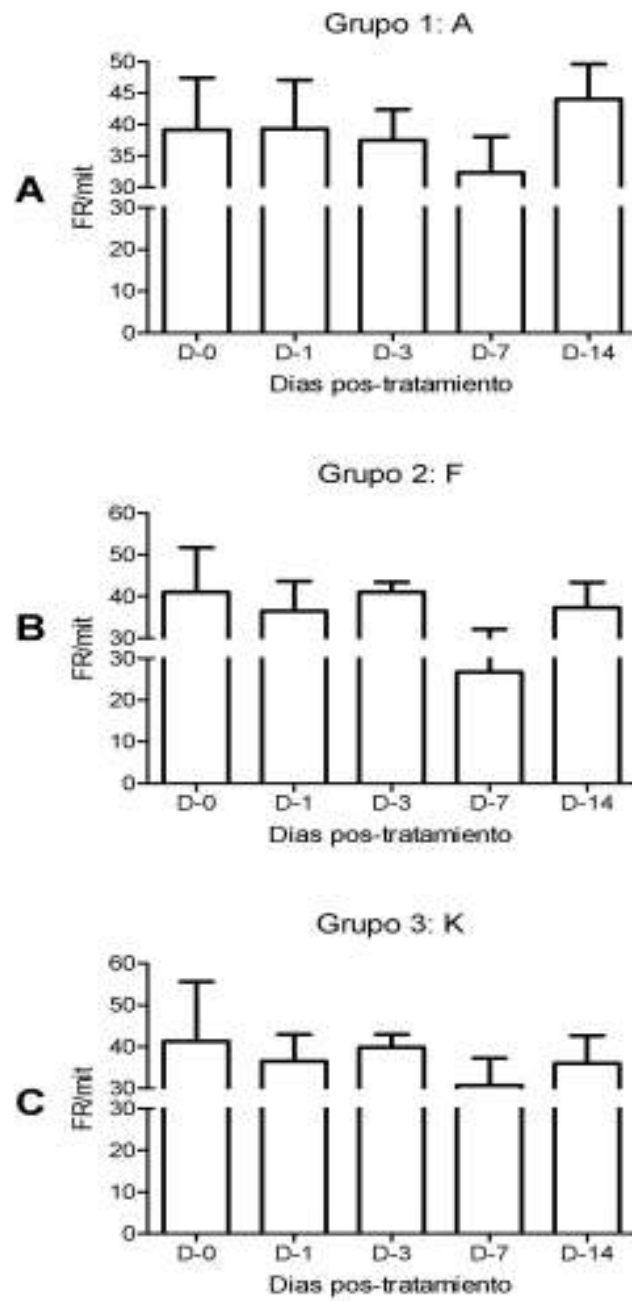


Figura 5. Frecuencia respiratoria 14 días post tratamiento.

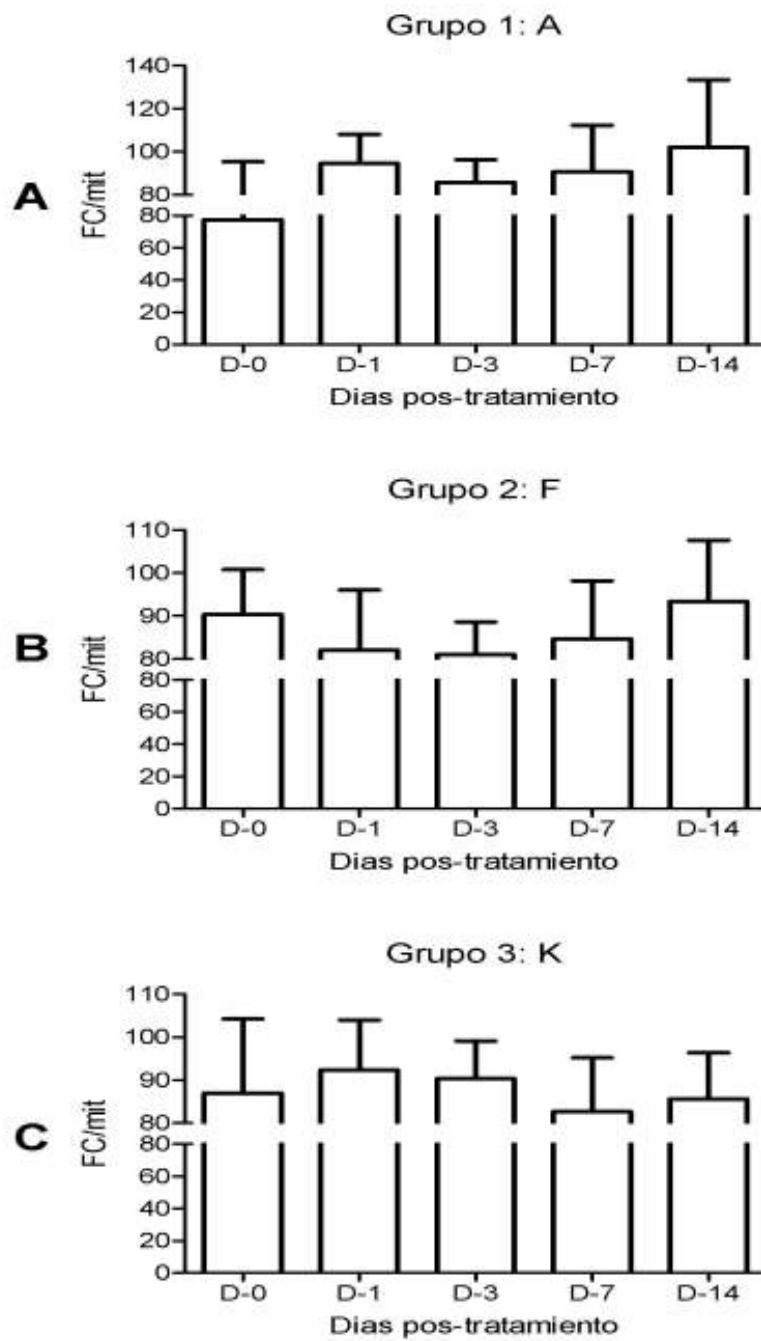


Figura 6. Frecuencia cardiaca 14 días post tratamiento.

7.3 Aplicación de las diferentes fórmulas del antibiótico macrólido y consumo de alimento

A todos los animales se les midió el consumo de alimento por día durante la fase experimental, esto permitió observar que en el consumo promedio de los animales en el periodo de experimentación no hubo diferencia estadística por grupo. (Figura 7). Sin embargo, se puede apreciar que independientemente a la formulación hay una disminución estadísticamente representativa en el consumo de alimento entre el día 0 y los días 1 y 2 post inoculación. (Figura 8).

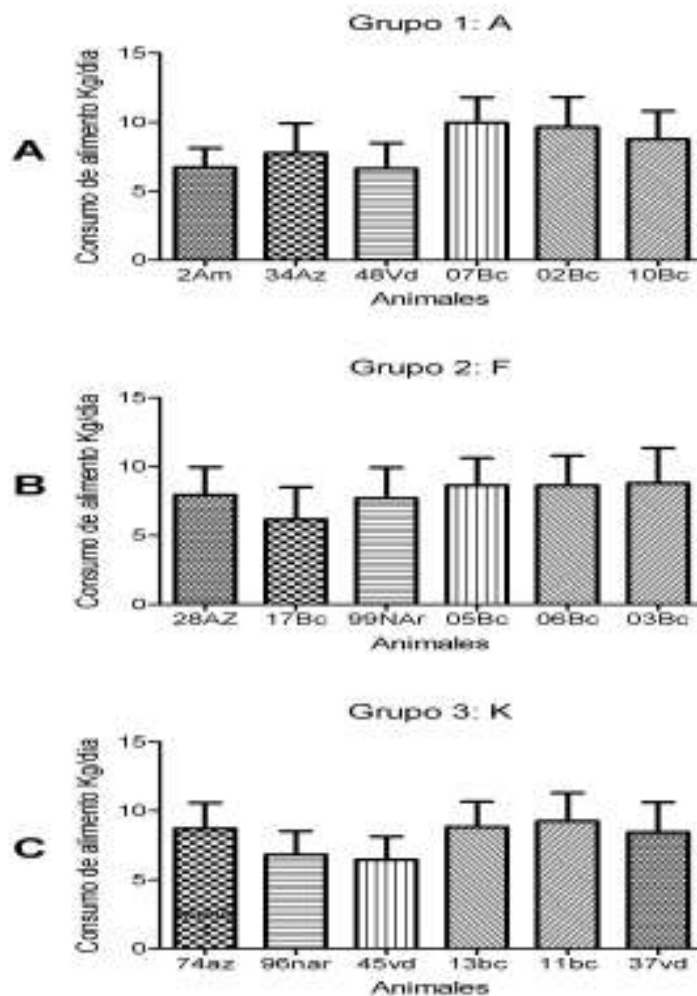


Figura 7. Consumo de alimento promedio por animal durante la fase experimental.

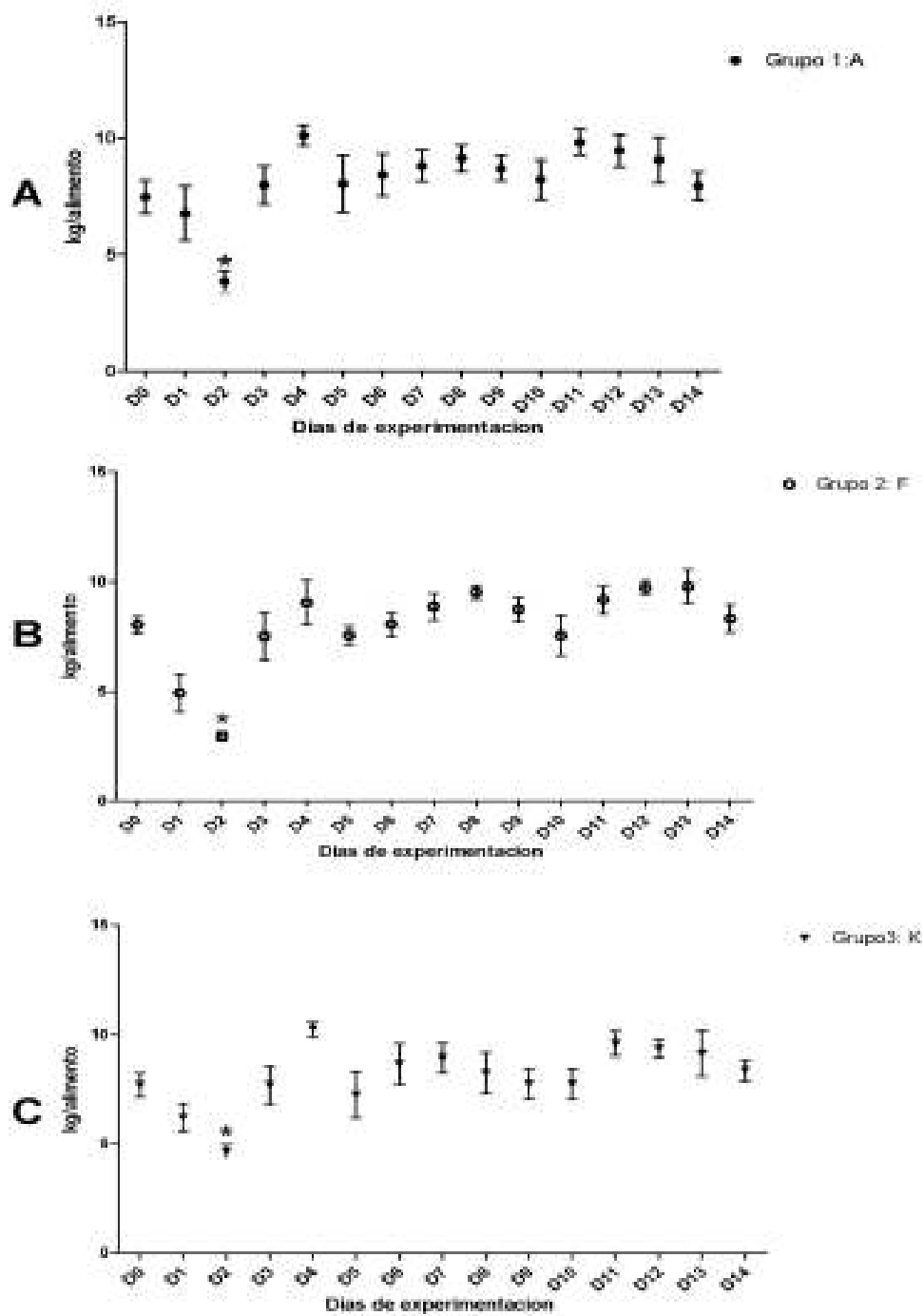


Figura 8. Consumo de alimento por día de los animales bajo estudio ($P < 0.05$).

7.4 Las tres formulaciones del producto de prueba indujeron inflamación en el sitio de aplicación

El grado de inflamación se midió con un vernier a todos los animales bajo estudio los días 1, 3, 7 y 14 post-tratamiento contemplando el largo, ancho, y espesor. Esto permitió observar que el producto de prueba (404.06) indujo inflamación en todos los animales independiente de la formulación. (**Cuadro 12**). Los datos fueron graficados y se observa que la inflamación del día 1 fue de aproximadamente 500 cm² independientemente de la formulación. Al día 3 disminuyó aproximadamente en 200 cm², al día 7 en 100 cm² y al día 14 en 20 cm². Con la formulación F involucionó antes del día 14 (Figura 9).

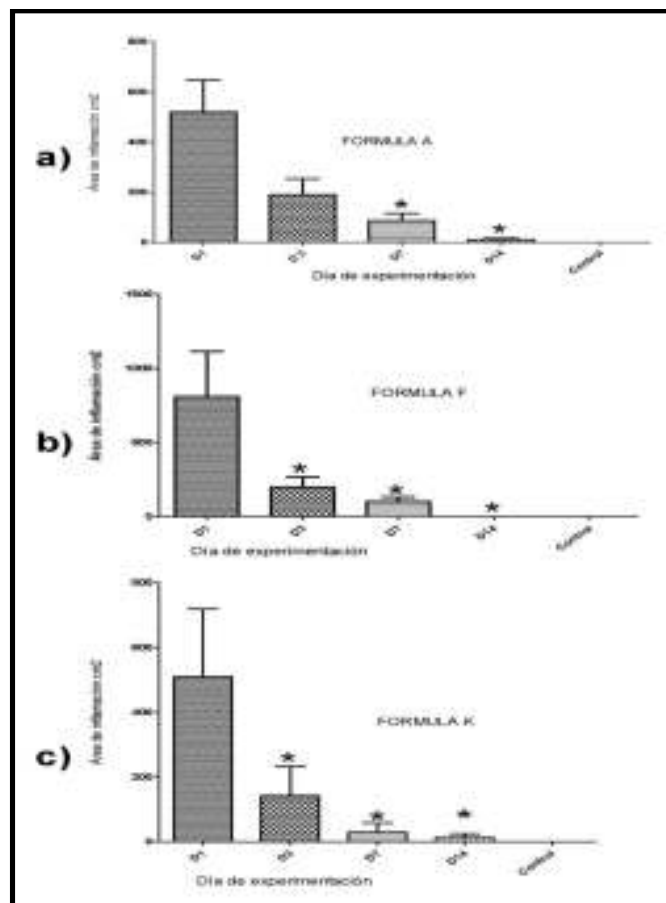


Figura 9.- áreas de inflamación a diferentes días post tratamiento de tres lotes diferentes.

Cuadro 12. Evaluación de parámetros de inflamación.

Grupos	Sexo	ID	Día 1				Día 3				Día 7				Día 14			
			A cm	L cm	Área cm ²	E. cm	A cm	L cm	Área cm ²	E. cm	A cm	L cm	Área cm ²	E. cm	A cm	L cm	Área cm ²	E. cm
Grupo 1:A	M	2Am	38	15	551	2	30	11	318	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	M	34 Az	39	19	741	5	20	13	260	4	18	8	151	5	3	4	9	1
	M	48 V	29	12	348	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H	07 B	0	0	0	0	0	0	0	0	12	8	97	2	0	0	0	0
	H	02 B	39	15	585	1	26	14	364	1	15	7	108	1	7	5	35	1
	H	10 B	32	28	896	2	25	8	200	2	19	9	166	2	5	5	20	1
Promedio			29.5	14.8	520	1.8	16.8	14.8	190.3	1.5	10.7	5.3	87	1.7	2.5	2.3	10.7	0.5
Grupo 2:F	M	28 Az	24	24	576	2	14	18	252	2	13	12	147	2	0	0	0	0
	M	17 B	33	20	660	2	33	14	446	2	15	11	171	2	0	0	0	0
	M	99 N	15	32	480	3	14	18	252	2	13	12	147	2	0	0	0	0
	H	05 B	50	44	2200	4	22	11	238	2	15	9	139	3	0	0	0	0
	H	06 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H	03 B	36	26	936	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio			26.3	24.3	808.7	2.5	13.8	10.3	198.0	1.3	9.3	7.3	100.7	1.5	0	0	0	0
Grupo 3:K	M	74 Az	7	5	34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M	96 N	39	13	507	4	52	9	463	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	M	45 V	51	22	1122	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H	13 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H	11 B	42	27	1134	1	30	13	390	4	18	10	175	4	11	7	73	3
	H	37 V	6	40	256	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio			24.2	17.8	508.8	1.5	13.7	3.7	142.2	1.0	3.0	1.7	29.2	0.7	1.8	1.2	12.2	0.5

*A=Ancho, L=Largo y E=Espesor

VIII. DISCUSIÓN.

En este estudio se analizó la seguridad y tolerancia de tres formulaciones del producto de prueba un antibiótico macrólido. El uso en humanos abarca una gran variedad de padecimientos infecciosos, incluyendo infecciones respiratorias, genitales y por toxoplasmosis. En medicina veterinaria ha sido poco estudiado, sin embargo, el perfil farmacocinético de los macrólidos han sido descritos en los potros a una dosis de 5 mg/ kg (Leclere *et al.*, 2012). En vacas lecheras con mastitis subclínica causada por *Staphylococcus aureus*, demostraron mantener altas concentraciones de 0.1 µg/mL en plasma y 10 µg/mL en leche después de 100 horas postratamiento aplicando 2 dosis de 10 mg/ kg (Lucas *et al.*, 2010).

El estudio de seguridad y tolerancia del elemento de las tres formulaciones de prueba a una dosis de 15 mL que representaron en promedio 12 mg/kg demostró, en las tres diferentes formulaciones, que inducen reacciones adversas que modifican las constantes fisiológicas de los animales bajo estudio. Al evaluar temperatura corporal se observó que aumenta 1 °C en promedio un día después del tratamiento, lo que puede ser relacionado con el bajo consumo de alimento entre los días 1 y 2 postratamiento. Esto principalmente asociado a la temperatura ≥ 39.4 °C que nos indicó fiebre. Al evaluar la tolerancia determinada por el grado de inflamación en el sitio de aplicación se demostró que el elemento de prueba indujo inflamación en el 100 % de los animales inoculados (18/18) independientemente de la formulación. Esto principalmente asociado a que se realizó una sola aplicación de 15 mL vía subcutánea, sin contemplar la dosis en mg/kg. Este parámetro puede influir en el efecto visto en el sitio de aplicación ya que los animales no estaban homogéneos en peso. También se pudo determinar que el primer día post aplicación la inflamación fue de más de 500 cm² en las tres formulaciones determinándose que el acoplamiento a los diferentes ácidos no influyó en el comportamiento del fármaco en las primeras 24 horas. Al tercer día se observó una disminución drástica en la inflamación observada en el sitio de aplicación, oscilando entre 200 cm². La disminución fue tiempo dependiente ya

que al 7 día se observaron 100 cm² aproximadamente. Para el día 14 se apreció que la aplicación de fórmula F ya no se percibió alteración en el sitio de aplicación, en contraste para la formula K y A donde si se tenía una alteración de 20 cm² aproximadamente, en promedio.

En base a estos resultados se puede inferir que la fórmula F manifestó una involución más rápida, comparada con las fórmulas A y K. Evaluando estos factores de variación se consideró que la inflamación observada principalmente fue atribuida a la dosis y al volumen de aplicación. Sin embargo, otra variante más podría ser que los animales utilizados tenían diversas alteraciones en los parámetros de hemograma y bioquímica sanguínea lo que no les permitió reaccionar de igual manera al antibiótico.

El empleo de dosis mayores a 2.5 mg/kg de macrólidos tiene que considerar las propiedades inmunomoduladoras que ejercen estos fármacos que pudieran predisponer a los animales a otras enfermedades principalmente favoreciendo un perfil proinflamatorio (Ribeiro *et al.*, 2009). La otra desventaja del uso de concentraciones mayores a 2.5 mg/kg de antibióticos macrólidos es la resistencia bacteriana que ha sido reportada por más de 60 especies de bacterias por ser fármacos de larga duración dentro del organismo (Roberts, 2011).

Sin embargo, este estudio es útil para la toma de decisiones en la mejora de la formulación final que nos permita un producto estable, eficaz listo para usarse en el tratamiento de enfermedades respiratoria en bovinos.

IX. CONCLUSIONES

La aplicación del fármaco macrólido en 3 diferentes formulaciones indujo un aumento de la temperatura corporal desencadenando efectos adversos como la baja ingesta del consumo de alimento en los primeros días.

Las tres formulaciones del macrólido aplicado por vía subcutánea en la tabla del cuello propiciaron un proceso inflamatorio en la totalidad de los animales tratados en el estudio de los cuales los inoculados con la formulación de F tuvieron una involución más rápida.

X. PERSPECTIVAS

El proyecto tiene como finalidad generar la infraestructura tecnológica y el desarrollo científico necesarios para la producción de una formulación antibiótica de un macrólido utilizado en el tratamiento de enfermedades respiratorias en bovinos. Para el desarrollo de este proyecto se ha integrado una red de investigación entre la empresa farmacéutica Laboratorios Virbac México SA de CV.", el Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUSEI) de la Universidad de Guadalajara y el Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Se han realizado modificaciones en el acoplamiento de ácidos con el ingrediente activo y se pretende obtener una fórmula químicamente estable y tolerada en bovinos a una dosis de 2-5 mg/kg de peso en bovinos.

A estas dosis recientemente se realizaron estudios de tolerancia y seguridad de producto teniendo como resultado un fármaco prototipo en la especie blanco, ahora se trabaja en establecimiento y validación de un método analítico para la determinación del analito en diversas matrices biológicas y el establecimiento de la dosis óptima para ser administrado por vía subcutánea. También se está

trabajando en la determinación CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), y en la determinación CMB (Concentración Mínima Bactericida)

Confidencialidad

El ingrediente activo y la combinación de ácidos para evitar inflamación/irritación del macrolido en los animales no es declarado ya que se está realizando un análisis de prospectiva tecnológica e intelectual para buscar una patente en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

XI. LITERATURA CITADA

Abraham E.P. y Chain E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev. Infect. Dis.* (10) 677–678.

Alanís-Reyes J.A. 2007. Revisión bibliográfica sobre los antibióticos macrólidos y su interés en medicina veterinaria. Servicio Profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 11-15.

Alekshun M.N., 2005. New advances in antibiotic development and discovery. Expert opinion on investigational. *Drugs.* 14, (2) 117–134.

Anadón A. y Reeve-Jhonson. L. 1999. Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomalenzymes: implications for veterinary medicine. *Res. Vet. Sci.* 66:197–203.

Baggot J.D. y Gingerich D.A. 1976. Pharmacokinetic interpretation of erythromycin and tylosin activity in serum after intravenous administration of a single dose to cows. *Res Vet Sci.* 3:318-323.

Bright G., Nagel A. y Bordner J., 1988. Synthesis, in vitro and in vivo activity of novel 9-Deoxo-9^a-Aza-9^a- homoerytjromycin a derivates. A new class of macrolide antibiotics, the azalides. *J. Antibiotics.* 41:1029-1047.

Burrows G.E., Griffin D.D., Pippin, A. y Harris K. 1989. A comparison of the various routes of administration of erythromycin in cattle. *J. Vet. Pharma. Therap.* 12:289-295.

Carbon C.1998. Pharmacodynamics of macrolides, azalides and streptogramins: effect on extracellular pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 27:28-32.

- Cester C.C., Laurentie M.P., García-Villar, R. y Toutain, P.L. 1990. Spiramycin concentrations in plasma and genital-tract secretions after intravenous administration in the ewe. *J. Vet. Pharma. Therap.* 13:7–14.
- Chambers H. 2003. Antimicrobianos inhibidores de las síntesis de proteínas y otros antibacterianos. En bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman y Gilman. Ed. McGraw Hill. Pp 1257-1286.
- Comisión Europea. 2001. The rules governing medicinal products in the European Union. Vol 9: Pharmacovigilance. Medicinal products for human and veterinary use. pp 6, 22-34.
- Cué. B.M. y Morejon G.M. 1998. Antibacterianos de acción sistémica: Parte II. Otros grupos de antibióticos. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* 14(4):362-373.
- Douthwaite, S., Hansen, L.H. y Mauvais P. 2000. The macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domains II of 23S rRNA. *Mol. Microbiol.* 36:183–192.
- Escolar J.M. Azanza P. y Pérez J.H. 1998. Macrólidos y lincosaminas. *Medicine.* 7(72):3337-3343.
- Garry K.W., Rubinstein M.H., Gotfried I.J. y Khan S.V. 2000. Long-term clarithromycin decreases prednisone requirements in elderly patients with prednisone- dependent asthma. *Chest.* 118(6):1826–1827.
- Giner A.S., Canós C.M., Rodilla C.F. y Ferrer G.C. 1995. Nuevos macrólidos ¿superan a eritromicina?. *Farm. Hosp.* (5). 259-265.
- Gingerich, D.A., Baggot J.D., Kowolski, J.J. 1977. Tylosin antimicrobial activity and pharmacokinetics in cows. *Can. Vet. J.* 18:96–100.

- González-Piñera J.G., Barreto P.J., Rodríguez R.M.A. y Pino A.P.P. 1998. Macrólidos. *Acta Médica*. 8(1):71-74.
- González-Pedraza A.A., Ortiz-Zaragoza C., Mota-Vázquez R., Dickinson-Bannack M.E., Dávila-Mendoza R. y Fernández-Ortega M.A. 2002. Sensibilidad antimicrobiana y caracterización de cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de un brote de escarlatina. *Sal. Púb. Mex.* 44:437-441.
- Goodman y Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9a Ed. México, McGraw-Hill Interamericana. pp 1205-1207.
- Gottlieb. D. y Shaw P. 1967. Antibiotics, Biosynthesis. Vol. 2 Edit. Springer-Verlag N. Y. Inc. USA. pp 155-180.
- Fuentes H.V. 1992. Farmacología y Terapéutica Veterinarias. Segunda Edición. Interamericana McGraw-Hill. México DF. Pp 120–136.
- Kataja, J., Huovinen, P., Skurnik, M. y Seppälä, H. (1999). Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. *Antimic. Agen. Chemoth.* 43(1):48-52.
- Keck G. e Ibrahim C. 2001. Veterinary pharmacovigilance: between regulation and science. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 24:369-373.
- Kudohs A. y Yamamoto M. 1998. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *J. Respir. Crit. Care. Med.* 157:1829–1832.
- Leclere, M., Magdesian, K.G., Cole, C.A., Szabo, N.J., Ruby, R.E., Rhodes, D.M., y Tell, L.A. (2012). Pharmacokinetics and preliminary safety evaluation of azithromycin in adult horses. *J. Vet. Pharma. Therap.* 35(6):541-549.

- Ledermann D.W. 2006. La historia de la penicilina y de su fabricación en Chile. *Rev. Chil. Infect.* 23(2):172-176
- Lucas M., Errecalde J. y Mestorino N. 2010. Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by staphylococcus aureus. *J Vet Pharmacol Ther.* 33:2132-2140.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. y Brock. 1999. Biología de los microorganismos. 8ª Ed. España, Editorial Prentice Hall Iberia. (2) 414-419.
- Mazzei T., Mini E.A., Noveffi A. y Periti P. 1993. Chemistry and mode of action of macrolides. *J. Antimic. Chemoth.* 31:1-9.
- Mensa J., Gatell J.M., Jiménez M., y Prats G. 2003. Macrólidos, cetólidos y estreptograminas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:200-208.
- Portillo B. A. 2003. Mecanismos de resistencia a antibióticos macrólidos, lincosaminas y estreptograminas en streptococcus y enterococcus. Universidad de la Rioja. Servicio de Publicaciones. ISBN-84-688-2331-7.
- Real Decreto. 1995. Sobre medicamentos veterinarios. Ministro de presidencia. Art. 41, 51. España. BOE-A-1995-5653. Pp 7-11.
- Retsema J, Girard A y Schelkly W. 1987. Spectrum and mode of action of azithromycin. A new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 31:1939-1947.
- Ribeiro C.M., Hurd H., Wu Y., Martino M. E. y Jones L. 2009 Azithromycin treatment alters gene expression in inflammatory, lipid metabolism, and cell cycle pathways in well-differentiated human airway epithelia. *PLoS ONE.* 4:6-10.

- Rivas L.M. 2005. Identificación de genes asociados a la resistencia a macrólidos en cepas de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico. Tesis de Licenciatura. Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México DF. México. pp 18-25.
- Roberts M.C. 2011. Environmental macrolide–lincosamide–streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Front Microbiol.* 2:40.
- Sanders, P., Moulin, G., y Guillot, P. 1992. Pharmacokinetics of spiramycin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in lactating cows. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 15:53–61.
- Shinkai M., Henke O. y Rubin B.K. 2008. Macrolide antibiotics as immunomodulatory medications: proposed mechanisms of action. *Pharma. Therap.* 117(3):393–405.
- Spector S y Katz F 1974. Troleandomycin: Effectiveness in steroid dependent asthma and bronchitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 54:228–31.
- Sumano H.S. y Ocampo C.L. 2006. Farmacología Veterinaria. Tercera Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México DF. 263 – 285.
- Waller, P.C. 1998. Pharmacovigilance: towards the next millennium. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 45:417.
- Waller, P.C. y Evans, S.J. W. 2003. A model for the future conduct of pharmacovigilance. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 12:17–29.
- Weisblum B. 2000. Resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics. *In: Fischetti V*, ed. Gram positive pathogens. Washington, DC, USA: ASM Press pp 694–710.

Weisel, M.K., Powers, J.D., Powers, T.E., Baggot, J.D. 1977. A pharmacokinetic analysis of tylosin in the normal dog. *Am. J. Vet. Res.* 38:273–275.

Zhanel, G.G., Walters, M., Noreddin, A., Vercaigne, L.M., Wierzbowski, A., Embil, J.M. y Hoban, D.J. (2002). The ketolides. *Drugs.* 62(12):1771-1804.

Ziv, G., Shem T.M., Glickman, Winkler, M. 1995. Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cow. *J. Vet. Pharma. Therap.* 18:340–345.