

**COMPARACIÓN DE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS Y EFECTOS
CITOTÓXICOS DE UNA FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE DOXICICLINA
HICLATO *IN VITRO* Y EN BIOMODELO CANINO MEDIANTE HPLC.**

Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario

Santiago Rodríguez Vélez

Asesor:

Santiago Monsalve Buriticá. MVZ, M.Sc, Dr. Sc. (c)

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de ciencias administrativas y agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria

Caldas- Antioquia

2018

Contenido

| | |
|-------------------------------------|----|
| Resumen..... | 5 |
| Introducción..... | 6 |
| Justificación..... | 8 |
| Marco teórico..... | 10 |
| Objetivos | 15 |
| Metodología..... | 16 |
| Resultados | 22 |
| Conclusiones y recomendaciones..... | 30 |
| Bibliografías..... | 31 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Se muestra el estado de las células luego de 24 horas de la aplicación de los tratamientos | 23 |
| Tabla 2. Estado de las células luego de 48 horas de aplicar los tratamientos | 23 |
| Tabla 3. Estado de las células luego de 72 horas de aplicar los tratamientos | 24 |
| Tabla 4. Conteo individual luego de realizar un promedio entre 4 lecturas de cada concentración, se aprecia que cada muestra se encuentra por duplicado | 24 |
| Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de cada uno de los tratamientos en función del tiempo | 25 |
| Tabla 6. Gráfica de barras de la media y desviación estándar del porcentaje de viabilidad de los tratamientos vs tiempo | 25 |

Lista de imágenes

| | |
|---|----|
| imagen 1. Se muestra la formación de monocapa en el fondo del frasco de cultivo | 17 |
| imagen 2. Se muestra el plato utilizado para el ensayo de aglutinación con los tratamientos adicionados por duplicado | 21 |
| Imagen 3. Platos de cultivo inmediatamente después de ser sembrados, sin alcanzar una fase de crecimiento exponencial y luego de 24 horas de recibir los tratamientos..... | 22 |
| imagen 4. Distribución de los tratamientos en el agar mueller hinton inoculado con <i>Bacillus cereus</i> . A. Sensidisco de tetraciclina (30µg). B. Dox-H estándar (30µg) C. Formulación liposomal (30µg) D. Blanco (Buffer phosphate saline ph 7.4) | 27 |
| imagen 5. Gráficos en los que se representa las medias de las muestras evaluadas..... | 28 |

Resumen

La Ehrlichiosis monocítica canina es una enfermedad transmitida por garrapatas que afecta principalmente a caninos a nivel global, el tratamiento de elección para su erradicación consiste en el suministro de doxiciclina hclato (dox-H) durante periodos de hasta 28 días, lo que sumado a la capacidad irritativa de la misma favorece la aparición de lesiones sobre el tracto gastrointestinal cuando se suministra por vía oral; la irritación en el punto de aplicación cuando es usada por vía parenteral también ha sido descrita, razón por la cual se ha optado por elaborar sistemas de liberación de doxiciclina que favorezcan la disminución de los efectos adversos como las formulaciones liposomales. En la urgencia por desarrollar nuevas alternativas de liberación controlada que sean más amigables con los pacientes se ha recurrido a la elaboración de estudios citotóxicos para determinar sus efectos dañinos antes de escalar al modelo canino. El presente estudio tuvo como objetivo comparar concentraciones plasmáticas y evaluar los efectos citotóxicos de una formulación liposomal para aplicación intravenosa. Los estudios de toxicidad arrojaron altos índices de mortalidad celular cuando se utilizó a una concentración 10 veces superior a la concentración mínima inhibitoria, razón por la cual se sugiere la elaboración de nuevos estudios en los que se contemple el uso de concentraciones similares a la dosis terapéutica reportada antes de escalar al biomodelo canino.

Palabras clave: Doxiciclina, Ehrlichia canis, liposomas, citotoxicidad.

Introducción

La doxiciclina es una tetraciclina de segunda generación la cual se encuentra disponible en el mercado generalmente como doxiciclina hclato (Dox-h), esta difiere de la oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina ya que presenta mayor liposolubilidad (Riond & Riviere, 1988) lo que favorece a una mayor capacidad de penetración tisular, mayor volumen de distribución y mejores propiedades antimicrobianas gracias a que su ingreso a las bacterias no depende de mecanismos de transporte activos, además esta tiene un mayor tiempo de vida media y una mayor capacidad de unión a proteínas plasmáticas (Gutierrez, Velasco, Vasquez, Vargas, & Sumano, 2012). Dox-H presenta un efecto bacteriostático, gracias a su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas bacterianas mediante la unión reversible a la sub unidad ribosomal 30s y al interferir en la unión de aminoacyl-tRNA al complejo mRNA ribosoma impidiendo el crecimiento bacteriano (Holmes & Charles, 2009). Su efecto antimicrobiano óptimo ha sido vinculado a tratamientos tiempo-dependientes ya que su mayor eficacia antimicrobiana se logra cuando es utilizada 2 a 4 veces por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Ruiz, Olvera, Chacón, & Estrada, 2015). Dox-h ha sido utilizado en animales y humanos como profilaxis y tratamiento de varias enfermedades bacterianas, generadas tanto por gram-positivas como por gram-negativas (Gutierrez et al., 2012; Riond & Riviere, 1988)., siendo a su vez considerado como el tratamiento de elección en ehrlichiosis monocítica canina (CME) (Iqbal & Rikihisa, 1994), enfermedad de distribución global generada por *Ehrlichia canis*, la cual requiere tratamientos por hasta 28 días (Eddlestone et al., 2007) La forma más común de

administración de Dox- H es por vía oral (única presentación disponible en Colombia) (ICA, 2016), lo que sumado a las terapias prolongadas necesarias favorece la aparición de lesiones sobre el tracto gastrointestinal (TGI) (Ruiz et al., 2015); sin embargo también presenta propiedades irritantes cuando es aplicada por vía intramuscular o subcutánea (Ole-Mapenay, Mitema, & Maitho, 1997). Es por esto y gracias al avance tecnológico de la industria farmacéutica que se ha buscado la creación de nuevas estrategias de liberación controlada de doxiciclina dirigidas a disminuir los efectos indeseados (Gutiérrez, Ocampo, Espinosa, & Sumano, 2014; D. Vargas-Estrada, Gracia-Mora, & Sumano, 2008). El presente estudio pretende realizar la descripción de un perfil farmacocinético de una formulación liposomal de Dox-H mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) *in vitro* y en un biomodelo canino luego de determinar la toxicidad celular en células DH82.

Justificación

El tratamiento de la CME requiere del uso de doxiciclina por periodos prolongados de hasta 28 días (Neer, Breitschwerdt, & Greene, 2002) lo que puede generar efectos adversos cuando se suministra por vía oral, tales como irritación gástrica, vómito e incluso ulceración de la mucosa gástrica(Arciniegas Ruiz, Gutiérrez Olvera, Bernad Bernad, Caballero Chacón, & Vargas Estrada, 2015), a pesar de esto las únicas presentaciones comerciales en el país se limitan a esta vía(ICA, 2016). La irritación tisular y dolor en el sitio de aplicación también han sido reportadas cuando se usa inyectada(Gutierrez et al., 2012; Ole-Mapenay et al., 1997; Smith & Leyden, 2005). Es por esto que ha habido un creciente interés en la creación de estrategias de liberación controlada de doxiciclina tales como las formulaciones liposomales las cuales han sido reconocidas como una excelente alternativa en la liberación de medicamentos , ya que estos imitan membranas biológicas y tienen la capacidad de almacenar medicamentos de naturaleza acuosa en su núcleo y a su vez medicamentos de naturaleza oleosa en su membrana bilipídica, estas presentan características importantes como la biocompatibilidad y la facilidad que tienen para adaptarse a necesidades propias. (Cornell, Fletcher, Middlehurst, & Separovic, 1982). Sin embargo estas formulaciones requieren de estudios detallados de toxicidad, así como estudios de farmacocinética para establecer las concentraciones plasmáticas que describen la interacción entre el antibiótico y el organismo(Beltrán, 2004),

Con este estudio se pretende comparar diferentes concentraciones plasmáticas y los efectos citotóxicos de un estructurado liposomal de doxiciclina intravenosa suministrada a diferente dosis e intervalos de tiempo *invitro* y en el biomodelo canino.

Marco teórico

La doxiciclina (Dox), descubierta en 1967 es un derivado semisintético de las tetraciclinas (segunda generación) ampliamente usada en humanos y animales domésticos como profilaxis y tratamiento de enfermedades causadas por múltiples agentes biológicos (Ruiz et al., 2015), generalmente se encuentra disponible como doxiciclina clorhidrato hemietanolato hemihidrato (hiclato) (Dox-h)(Ole-Mapenay et al., 1997); esta difiere de la oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina, las cuales son 5 a 10 veces más lipofílica y presenta una mayor capacidad de unión a proteínas, lo que resulta en una mayor facilidad para penetrar tejidos, mayor volumen de distribución, mejores propiedades antimicrobianas y una vida media más prolongada tanto en humanos como en animales (Abd El-Aty, Goudah, & Zhou, 2004; Gutierrez et al., 2012; Riond & Riviere, 1988). Dox-h presenta efecto bacteriostático gracias a su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas bacterianas mediante la unión reversible a la sub unidad ribosomal 30s y al interferir en la unión de aminoacil-tRNA al complejo mRNA ribosoma impidiendo el crecimiento bacteriano (Holmes & Charles, 2009). Esta presenta mejor eficacia clínica cuando es usada a dosis bajas, cómo 2 a 4 veces la concentración mínima inhibitoria (CIM) para microorganismos susceptibles por lo que este mecanismo antimicrobiano se considera principalmente tiempo dependiente (Ruiz et al., 2015; D. Vargas-Estrada et al., 2008). En caninos es usada para controlar infecciones generadas por agentes como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Brucella* spp., *Pasteurella* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. y *Ehrlichia*

canis(Arciniegas Ruiz et al., 2015; Gutierrez et al., 2012; Riond & Riviere, 1988), siendo la última de vital interés ya que es considerada como agente causal de la ehrlichiosis monocítica canina (CME), enfermedad crónica y a veces fatal en perros que presenta distribución global y es transmitida por garrapatas(Aguiar, Zhang, Braga, Taques, & McBride, 2016; McClure et al., 2010) la cual también ha sido reportada en humanos generando ehrlichiosis humana (Bouza-Mora et al., 2017; Perez, Bodor, Zhang, Xiong, & Rikihisa, 2006). A pesar de ser el tratamiento de elección en CME hay reportes que cuestionan la eficacia de Dox-h para la eliminación total de *Ehrlichia canis* durante fases pos-agudas de la infección, sometiendo a los animales a tratamientos prolongados (Harrus, Waner, Aizenberg, & Bark, 1998; Iqbal & Rikihisa, 1994), mientras que otros reafirman su eficacia, cuando se instaura tratamientos por hasta 4 semanas en la fase aguda (Eddlestone et al., 2007). Según Neer, M. *Et al.* El tratamiento más efectivo contra la Ehrlichiosis se logra suministrando doxiciclina a 10 mg/kg vía oral (VO) cada 24 horas por 28 días(Neer et al., 2002), lo que favorece la aparición de alteraciones sobre el TGI como irritación del esófago y estómago, riesgo de ulceración, vómito, entre otros(Riond & Riviere, 1988; Ruiz et al., 2015; Smith & Leyden, 2005; Xiao, Zhao, Hart, & Semrad, 2013),también ha sido reportada la aparición de irritación y dolor en el sitio cuando se aplica inyectada por vía subcutánea o intramuscular (Gutierrez et al., 2012; Ole-Mapenay et al., 1997; Smith & Leyden, 2005) lo que explica por qué las presentaciones parenterales de Dox-h no están disponibles en todo el mundo (Vargas, Gutierrez, & Gonzalez, 2008) incluyendo a Colombia (ICA, 2016). Gracias al desarrollo tecnológico en la industria farmacéutica, se ha generado un creciente interés en la creación de nuevas estrategias de liberación controlada de

medicamentos (Lam & Gambari, 2014) como los nanoestructurados liposomales, los cuales han sido reconocidos como un excelente sistema de liberación de medicamentos, ya que estos básicamente imitan membranas biológicas y tienen la capacidad de almacenar medicamentos de naturaleza acuosa en su núcleo y a su vez medicamentos de naturaleza oleosa en su membrana bilipídica, estas vesículas pueden tener tamaños que varían desde los 20 nm hasta varias decenas de micrómetros, estas presentan características importantes como la biocompatibilidad y la facilidad que tienen para adaptarse a necesidades propias. Las formulaciones liposomales pueden variar en múltiples factores como la composición, fluidez de la membrana bilipídica, diámetro, carga de la superficie o lamelalidad (Cornell et al., 1982). A pesar de que los liposomas tienen un potencial prometedor en el transporte de fármacos, varios factores como la baja eficacia de encapsulación, la vida media corta, la inestabilidad, la agregación, la mala reproducibilidad y las posibilidades limitadas de esterilización son limitantes frecuentes en su producción. Adicionalmente los liposomas una vez ingresan al sistema circulatorio pueden generar activación inmediata del sistema inmune innato al entrar en contacto con diferentes componentes sanguíneos, dependiendo del tamaño de las vesículas, la forma, carga y composición (Senior, 1987). Varias formulaciones de liberación controlada de doxiciclina han sido estudiadas, en caninos una formulación de doxiciclina de larga acción inyectable demostró los máximos valores de biodisponibilidad y concentración máxima en suero en un estudio realizado en el que se comparó con Dox-h aplicada por vía intravenosa e intramuscular, sin embargo se encontró la presencia de pequeños abultamientos no dolorosos en el área de inyección (Gutierrez et al., 2012). En terneros se probó una formulación en

la que fue adicionado β -Cyclodextrina para prevenir la irritación local luego de su aplicación sub cutánea, lo cual se demostró como efectivo al disminuir la irritación local, además se obtuvieron grandes valores de biodisponibilidad comparada con Dox-h y se describió un intervalo de aplicación de hasta 80 horas (D. Vargas-Estrada et al., 2008), estudios similares fueron desarrollados en pequeños rumiantes (Vargas et al., 2008), cerdos (Gutiérrez et al., 2014) y ratas (Dinorah Vargas-Estrada, Gutiérrez, Juarez-Rodríguez, & Sumano, 2008), en los cuales se estudió la farmacocinética y se demostró mejores resultados que con Dox-h en todos los casos; en caninos también fue probada una formulación oral de doxiciclina con polímeros de ácido acrílico y polimetacrilato la cual demostró una liberación controlada que permite intervalos de aplicación de hasta 48 horas (Ruiz et al., 2015). En general las nuevas estrategias utilizadas para liberación controlada de medicamentos han demostrado ser útiles ya que pueden reducir la frecuencia de administración del tratamiento, el estrés del paciente durante la aplicación, los efectos adversos y el costo del mismo (Arciniegas Ruiz et al., 2015). En el caso del desarrollo de nuevas formulaciones se requiere de la realización de ensayos *In vitro* los cuales permiten conocer el comportamiento de las mismas antes de ser probadas en estudios clínicos (Marovac, 2001), además de la realización de estudios farmacocinéticos, ya que son una herramienta útil para evaluar la forma de dosificación luego de la administración *In vivo* de la nueva formulación a probar, esto requiere de métodos analíticos sensibles que permitan determinar concentraciones bajas del fármaco en muestras pequeñas (Ruz et al., 2004). Varios métodos han sido utilizados para la medición analítica de doxiciclina, como técnicas espectrofotométricas, microbiológicas, fluorimetría, cromatografía gas-líquido,

cromatografía en capa delgada (Axisa, Naylor, Bell, & Thompson, 2000; Ramesh et al., 2011; Ramesh, Basavaiah, & Rajendraprasad, 2010), las cuales han demostrado ser efectivas pero poco específicas cuando se mide doxiciclina en muestras biológicas sino hay una buena eliminación de metabolitos y componentes endógenos ya que estos interfieren con la medición (Ruz et al., 2004). La técnica de medición con HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) ha demostrado ser más sensible y específica ya que permite una mayor velocidad de determinación en ensayos, por lo que ha sido la técnica más utilizada para la medición analítica de doxiciclina (Axisa et al., 2000). La cromatografía se basa en una serie de técnicas utilizadas para separar los diferentes componentes en una muestra basándose en las afinidades relativas de estos componentes entre una fase móvil y una fase estacionaria. Para generar dicha separación es necesario hacer uso de un cromatógrafo el cual está compuesto por un sistema de control de fase móvil, un inyector, una columna (fase estacionaria) y un detector. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica de cromatografía líquida que utiliza columnas rellenas de partículas de 3-10 mm de diámetro, en el cual se requiere que la fase móvil sea forzada a través de una bomba, a menudo a presiones superiores a 500 psi, con la finalidad de separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y dicha columna (Sadek, 2004)

Objetivos

Objetivo General:

Comparar concentraciones plasmáticas y el efecto citotóxico de un nanoestructurado liposomal de doxiciclina hiclato *in vitro* y en el biomodelo canino.

Objetivos específicos:

1. Determinar los efectos citotóxicos de un nanoestructurado liposomal de doxiciclina hiclato en líneas celulares DH82.
2. Evaluar la efectividad bacteriostática de un nanoestructurado liposomal de doxiciclina hiclato.
3. Determinar el perfil farmacocinético en plasma y en un biomodelo canino de un nanoestructurado liposomal de doxiciclina hiclato.

Metodología

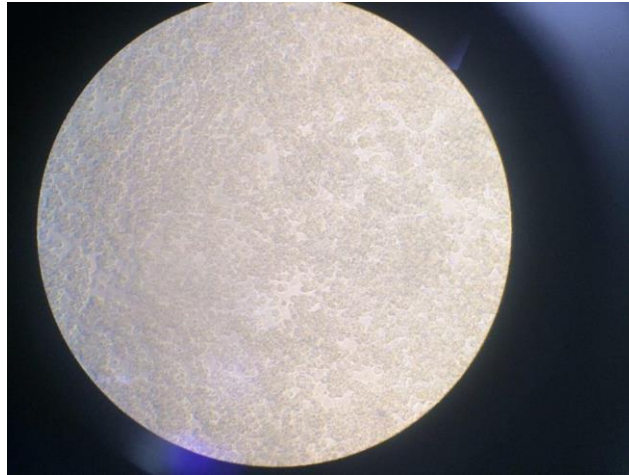
Preparación y caracterización de la formulación liposomal

Esta fue desarrollada en un estudio previo (Gallego Londoño, 2017)

Determinar los efectos de toxicidad celular de un nanoestructurado liposomal de Doxiciclina hiclato en cultivos de líneas celulares DH82

Cultivos celulares: Se hizo uso de líneas celulares DH82 (provenientes de un histiocitoma maligno de canino) las cuales fueron donadas gentilmente por el Doctor Esteban Arroyave Sierra. Estas fueron cultivadas en frascos Falcon de 25 cm en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 5% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de Hepes en una incubadora a 37°C de temperatura y una atmósfera de 5% de CO₂ hasta que el cultivo alcanzó una formación en monocapa.

imagen 1. Se muestra la formación de monocapa en el fondo del frasco de cultivo



Ensayo de citotoxicidad: Para esto se utilizó una adaptación de las metodologías propuestas por (Chikazawa et al., 2014; Gomes & Fernandes, 2007; Igartúa et al., 2015; Silva, Fachin, Beleboni, França, & Marins, 2013) modificándola a las condiciones propias de trabajo en el laboratorio. La toxicidad celular se determinó mediante la fórmula de viabilidad celular luego de la aplicación de diferentes concentraciones de la formulación liposomal y de un control en células sembradas en platos de cultivo (Cellstar) de 12 pozos. Una concentración final de 4×10^5 células fueron sembradas en cada pozo y se adicionó 1 ml de medio DMEM con 5% de SFB y 1% de Hepes. En el momento en el que apreció la formación de la monocapa se adicionó diferentes concentraciones conocidas del nanoestructurado liposomal y de Dox-H comercial, y se comparó con un control (phosphate buffered saline, PBS). Concentraciones de Dox-H y de la formulación liposomal (0.03 mg/ml y 0.3 mg/ml para ambos) al igual que el control (1:10) fueron diluidas medio DMEM con 5% SFB y 1% HEPES en tubos previamente marcados y esterilizados, logrando un volumen final de 1 ml/ pozo. Cada una de las diluciones

realizadas a partir de las dos concentraciones de Dox-h, de la formulación liposomal y el control fueron adicionadas en células cultivadas bajo las condiciones previamente establecidas. Cada concentración se adicionó por duplicado y se realizó lectura a las 4, 24, 48 y 72 horas (4 platos de 12 pozos cada uno). Al momento de la lectura se adicionó 150 µl de tripsina a cada pozo, se llevó a incubar por 15 minutos bajo las mismas condiciones y posteriormente se utilizó un embolo de jeringa de 1 ml para facilitar el desprendimiento de las células realizando un raspado suave sobre la superficie del pozo. Un total de 1 ml fue recuperado de cada uno de los pozos y se depositó en tubos eppendorf previamente marcados y esterilizados, los cuales fueron llevados a centrifugar durante 5 minutos a 3500 rpm con el fin de precipitar las células. El sobrenadante resultante fue desechado y las células se resuspendieron posteriormente en medio DMEM nuevo con el fin de inactivar la tripsina. Luego de realizar un buen mezclado con ayuda de una micropipeta se tomó 10 µl de la suspensión y se mezcló con 10 µl de azul de Evans para realizar la correspondiente lectura y conteo con ayuda de la cámara de Neubauer® en un microscopio a 10X. Este proceso se repitió para cada uno de los tratamientos.

Evaluar la efectividad bacteriostática de una formulación liposomal de Doxiciclina hiclato Vs control, en cultivos bacterianos

Para lo cual se hizo uso de colonias de *Bacillus cereus*, las cuales se encontraban almacenadas a -80°C. Estas fueron inoculadas en medio cerebro-

corazón (BHI) y se mantuvieron a 37°C durante 24 horas, momento en el cual se determinó su concentración final con ayuda del patrón McFarland. (250 µl del inóculo a una concentración final de 4×10^9 fueron depositados en agares mueller hinton, los cuales fueron mantenidos a 37°C durante 48 horas y se realizó antibiogramas con sensidiscos de tetraciclina (30 µg) con el fin de determinar el halo de inhibición y hacer comparaciones del mismo con la formulación liposomal y Dox-H comercial a la misma concentración (30µg). Tanto la formulación liposomal como la Dox-h comercial fueron previamente diluidas en buffer fosfato Ph 7.4 para posteriormente ser depositadas en el agar en un trozo de papel absorbente del mismo tamaño empapado con las mismas. Esto además permitió establecer un perfil de atrapamiento y liberación. (Shanmuganathan, Shanumugasundaram, Adhirajan, Ramyaa Lakshmi, & Babu, 2008). Los halos de inhibición desarrollados fueron medidos con ayuda de una regla para determinar a su vez la sensibilidad del agente a los antibióticos usados. El estudio fue realizado por triplicado para obtener un mayor nivel de confianza.

Determinar el perfil farmacocinético en plasma y en un biomodelo canino de una formulación liposomal de Doxiciclina hiclato.

Estabilidad coloidal en plasma canino

La posible agregación o aglutinación de la formulación liposomal fue evaluada y comparada al agregar muestras con diferentes concentraciones de la siguiente manera: A. 100 μ l de plasma canino, B. 100 μ l de plasma canino + 1 μ l de la formulación sin Dox-h, C. 100 μ l de plasma canino + 10 μ l de la formulación sin Dox-H, D. 100 μ l de plasma canino + 0.003mg de Dox-h, E. 100 μ l de plasma canino + 0.03mg de Dox-h, F. 100 μ l de plasma canino + 0.003mg de Dox-h en la formulación liposomal, G. 100 μ l de plasma canino + 0.03mg de Dox-h en la formulación liposomal. La concentración inicial de la formulación liposomal fue de 0.33905 mg/ml la cual fue diluida en buffer fosfato hasta alcanzar las concentraciones mencionadas. El estudio se realizó en un plato para ELISA (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96-Well Plates Clear Pinchbar MaxiSorp™ Flat-Bottom), en el cual se prepararon las muestras por duplicado y posteriormente se hizo lectura en un espectrofotómetro (Synergy HT Multi-detection reader) a 400, 450, 500 y 550 nm. La estabilidad de la formulación en plasma se basó en comparar la turbidez obtenida respecto al plasma solo (Li et al., 2016; Lopes De Azambuja et al., 2015)

imagen 2. Se muestra el plato utilizado para el ensayo de aglutinación con los tratamientos adicionados por duplicado



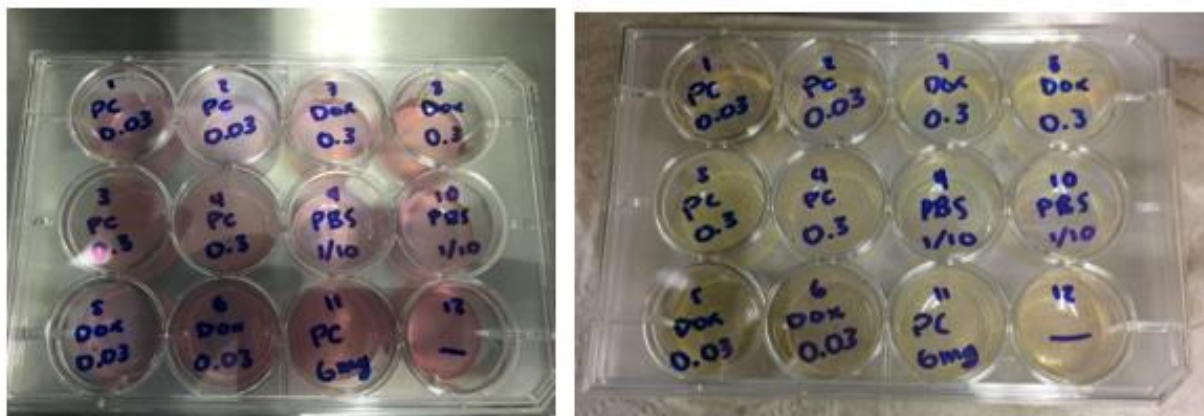
El tratamiento final aplicado al biomodelo canino será realizado siempre y cuando se obtengan resultados (citotoxicidad y aglutinación) que al ser analizados permitan la aplicación sin generar ningún tipo de riesgo para la salud del animal.

Resultados

Determinar los efectos de toxicidad celular de un nanoestructurado liposomal de Doxiciclina hiclato en cultivos de líneas celulares DH82

Luego de determinar que las células en los pozos dentro de los platos de cultivo habían alcanzado una etapa de crecimiento exponencial se procedió a realizar las respectivas lecturas.

Imagen 3. Platos de cultivo inmediatamente después de ser sembrados, sin alcanzar una fase de crecimiento exponencial y luego de 24 horas de recibir los tratamientos



A continuación se muestran los resultados obtenidos luego de realizar el ensayo previamente descrito:

Tabla 1. Se muestra el estado de las células luego de 24 horas de la aplicación de los tratamientos

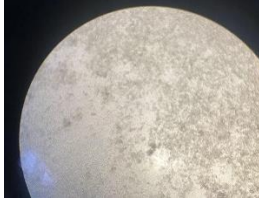

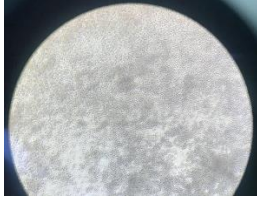

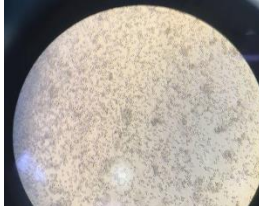
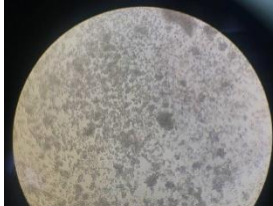
| | | | |
|---|---|--|---|
| DMPC (0.03 Mg/ ml Dox-H) | DMPC (0.3 mg/ ml Dox-H) | Dox-H (0.03 mg/ ml)... | Dox-H (0.3 mg/ ml).... |
|  |  |  |  |
| DMPC (6 mg/ml) | Control (PBS) | | |
|  |  | | |

Tabla 2. Estado de las células luego de 48 horas de aplicar los tratamientos

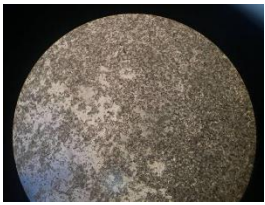
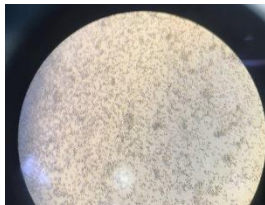
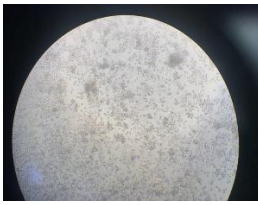
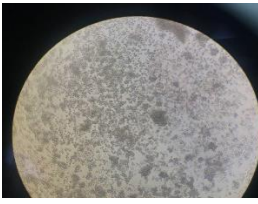
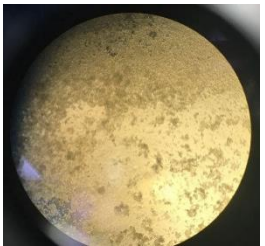
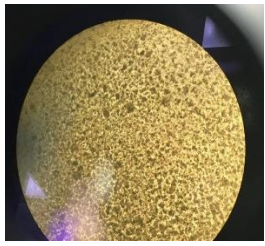
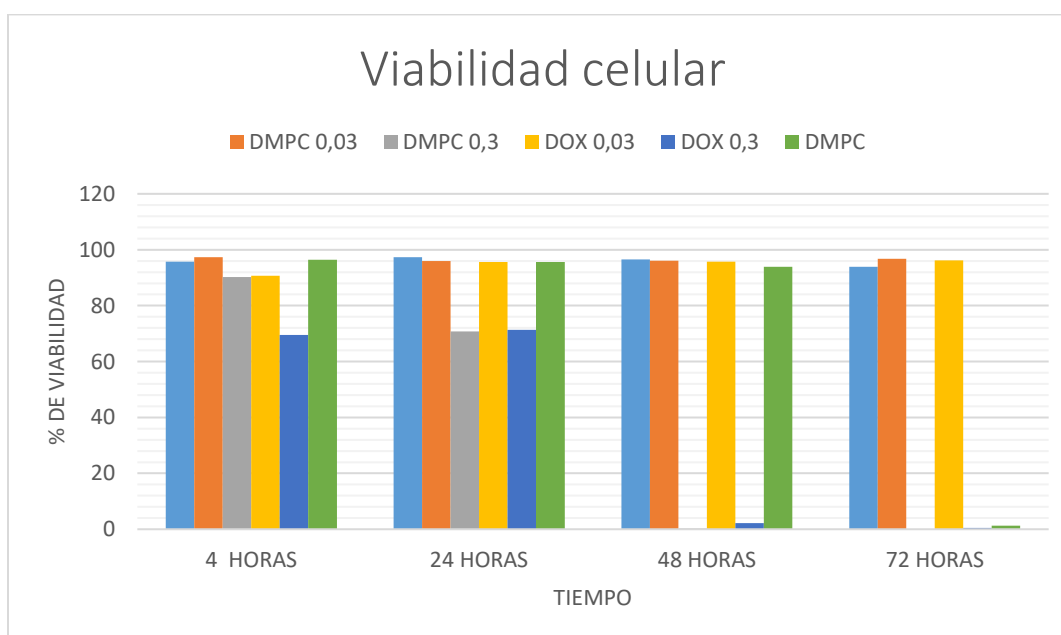
| | | | |
|---|---|--|---|
| DMPC (0.03 Mg/ ml Dox-H) | DMPC (0.3 mg/ ml Dox-H) | Dox-H (0.03 mg/ ml)... | Dox-H (0.3 mg/ ml).... |
|  |  |  |  |
| DMPC (6 mg/ml) | Control (PBS) | | |
|  |  | | |

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de cada uno de los tratamientos en función del tiempo

| MUESTRAS | | % DE VIABILIDAD | | | |
|----------------------------|----|-----------------|-------|-------|-------|
| | | 4 H | 24H | 48H | 72H |
| DMPC + 0.03µg Dox- H | R1 | 96,97 | 96,00 | 94,92 | 97,65 |
| | R2 | 97,76 | 95,84 | 97,13 | 95,90 |
| DMPC + 0.3µg Dox-H | R1 | 89,61 | 64,93 | 0,49 | 0,00 |
| | R2 | 90,83 | 76,69 | 0,00 | 0,00 |
| Dox-H 0.03 µg | R1 | 90,91 | 95,91 | 96,42 | 95,99 |
| | R2 | 90,49 | 95,34 | 94,97 | 96,36 |
| Dox-H 0.3 µg | R1 | 84,30 | 70,67 | 3,55 | 0,56 |
| | R2 | 54,72 | 72,01 | 0,76 | 0,38 |
| PBS | R1 | 94,94 | 97,40 | 97,62 | 92,13 |
| | R2 | 96,56 | 97,45 | 95,42 | 95,64 |
| DMPC | R1 | 96,41 | 95,57 | 93,90 | 1,30 |

Tabla 6. Gráfica de barras de la media y desviación estándar del porcentaje de viabilidad de los tratamientos vs tiempo

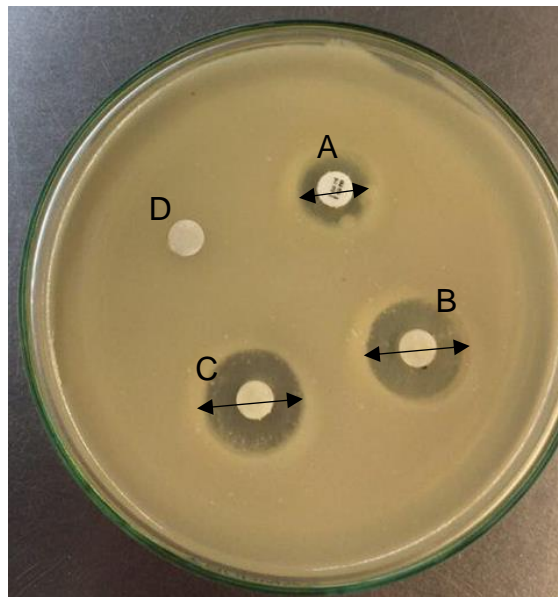


Se observa una estabilidad de las células en general durante las primeras 4 y 24 horas, sin embargo en ambas se nota una pequeña diferencia con Dox-H (0.3 mg/ml), que se vuelve similar a las 24 horas entre Dox-H (0.3 mg/ml) y DMPC + Dox-H (0.3 mg/ml) posiblemente ligado a la alta saturación con Dox-H. Luego de 48 horas la mortalidad celular en los mismos tratamientos mencionados anteriormente aumenta considerablemente, lo cual también ocurre con la formulación DMPC a las 72 horas de aplicación. No se observa una mortalidad uniforme entre los diferentes tratamientos y se aprecia una viabilidad levemente mayor en la formulación DMPC + Dox-H (0.03 mg/ml) a las 72 horas de lectura.

Evaluar la efectividad bacteriostática de una formulación liposomal de Doxiciclina hiclato Vs control, en cultivos bacterianos

Una vez las colonias de *Bacillus cereus* llegaron a una fase de crecimiento exponencial, aproximadamente a las 48 horas de sembradas fueron retirados de la incubadora y se hizo mediciones de los halos de inhibición obtenidos con los diferentes tratamientos aplicados.

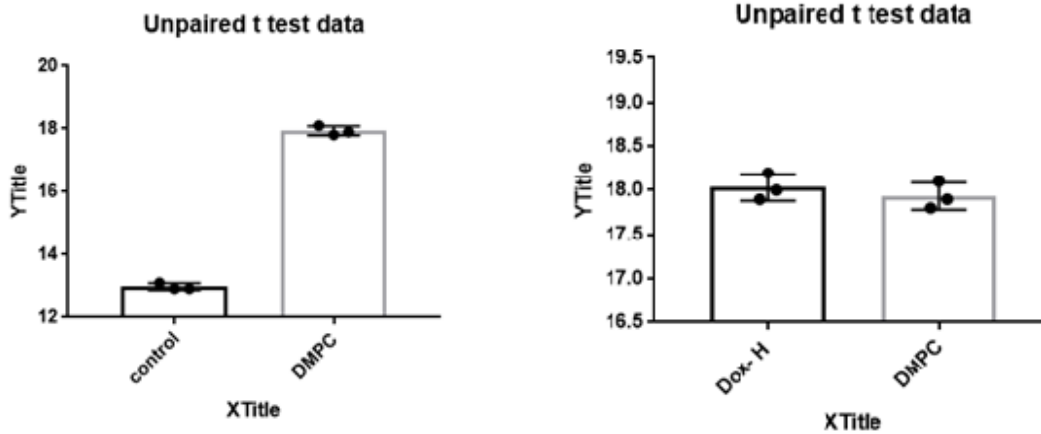
imagen 4. Distribución de los tratamientos en el hagar mueller hinton inoculado con *Bacillus cereus*. A. Sensidisco de tetraciclina (30 μ g). B. Dox-H estándar (30 μ g) C. Formulación liposomal (30 μ g) D. Blanco (Buffer phosphate saline ph 7.4)



La medición de los halos de inhibición se realizó en milímetros, arrojando los resultados expresados a continuación: A. Sensidisco de tetraciclina 30 μ g (13 mm), B. Dox-H estándar comercial 30 μ g (18 mm), C. Formulación liposomal 30 μ g (18 mm) y D. Blanco (0 mm)

Se realiza la prueba no paramétrica para dos muestras independientes de igual tamaño (mann Whitney- Wilcoxon), la cual arroja que no existe una diferencia estadística significativa ($p=0.25$) entre las medias obtenidas entre los tratamientos DMPC vs Dox-H, igualmente la significancia es inexistente entre DMPC Vs Tetraciclina ($p=0.100$).

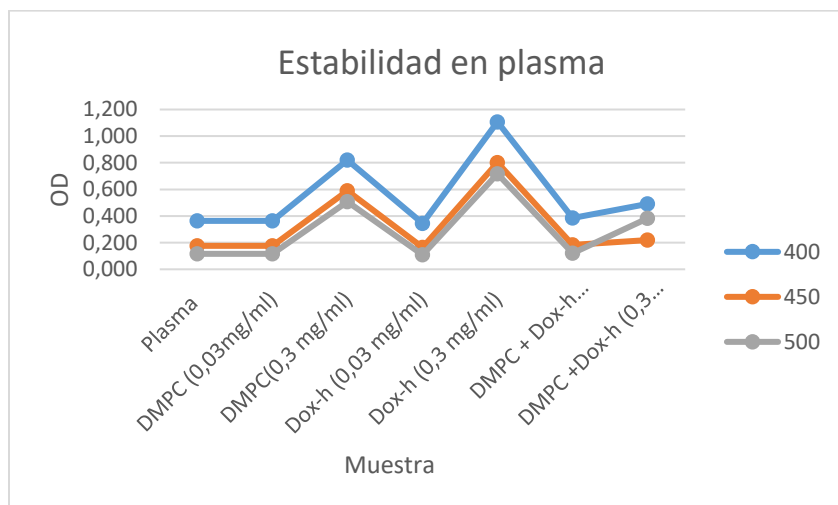
imagen 5. Gráficos en los que se representa las medias de las muestras evaluadas.



Determinar el perfil farmacocinético en plasma y en un biomodelo canino de un nanoestructurado liposomal de doxiciclina hclato.

La influencia de las diferentes concentraciones de los tratamientos utilizados fue monitoreada por cambios en la turbidez a 400, 450 y 500 nm, en las formulaciones DMPC + Dox-H (0.3 mg/ml), DMPC (0.3 mg/ml) y Dox-H (0.3 mg/ml) se notó un marcado aumento en la turbidez en todas las longitudes de onda utilizadas, lo que puede indicar un proceso de aglomeración resultado de un crecimiento del tamaño de las partículas. (Lopes De Azambuja et al., 2015)

Tabla 4. En la cual se aprecia los resultados obtenidos luego de someter los tratamientos al espectrofotómetro y medir a 400, 450 y 500 nm.



Conclusiones y recomendaciones

Los altos niveles de toxicidad arrojados por la formulación liposomal y Dox-H a partir de la 48 horas de agregados los tratamientos indican la necesidad de realizar un nuevo estudio de citotoxicidad en donde se incluyan nuevas concentraciones como la concentración terapéutica (0.09 a 0.160 mg/ml).

La incapacidad de la formulación liposomal para atravesar las membranas utilizadas de 0.02 μm establecen que luego de realizar el proceso de fabricación de la misma, incluso al pasar por un extrusor con una membrana con tamaños de poro igual hay agregación nuevamente de los liposomas generados, lo que se debe corregir con procesos que garanticen una homogeneidad mayor en el resultado final.

El proceso de fabricación de la formulación liposomal no garantiza una esterilidad completa del producto final, lo que sumado a la variación del tamaño de la misma implica un riesgo para la salud del animal que sería sometido al tratamiento intravenoso con la formulación, esto sumado a la ausencia de estudios de interacción inmunológica con el biomodelo canino soporta la no utilización de la formulación en el mismo.

Bibliografías

- Abd El-Aty, A. M., Goudah, A., & Zhou, H. H. (2004). Pharmacokinetics of doxycycline after administration as a single intravenous bolus and intramuscular doses to non-lactating Egyptian goats. *Pharmacological Research*, *49*(5), 487–491. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2003.10.012>
- Aguiar, D. M., Zhang, X., Braga, I. A., Taques, I. I. G. G., & McBride, J. W. (2016). Detection of genotype-specific Ehrlichia canis exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *7*(1), 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.10.003>
- Arciniegas Ruiz, S. M., Gutiérrez Olvera, L., Bernad Bernad, M. J., Caballero Chacón, S. D. C., & Vargas Estrada, D. (2015). Comparative pharmacokinetics of a new oral long-acting formulation of doxycycline hyclate: A canine clinical trial. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *80*, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.012>
- Axisa, B., Naylor, a R., Bell, P. R., & Thompson, M. M. (2000). Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, *744*(2), 359–365. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00261-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00261-9)
- Beltrán, C. (2004). EL MÉDICO CLÍNICO Y LA COMPRENSIÓN REAL Y PRÁCTICA DE ALGUNOS TEMAS Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics: clinical usage. *Rev Chil Infect*, *21*(1), 39–44. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182004021100008>
- Bouza-Mora, L., Dolz, G., Sol??rzano-Morales, A., Romero-Zu??iga, J. J., Salazar-S??nchez, L., Labruna, M. B., & Aguiar, D. M. (2017). Novel genotype of Ehrlichia canis detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *8*(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.012>

- Chikazawa, S., Kitahara, Y., Ando, E., Hori, Y., Hoshi, F., Kanai, K., ... Higuchi, S. (2014). Erythrophagocytosis enhances heme-dependent cytotoxicity of antimalarial drugs in canine histiocytic sarcoma cell line DH82. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 76(2), 249–53. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0319>
- Cornell, B. A., Fletcher, G. C., Middlehurst, J., & Separovic, F. (1982). The lower limit to the size of small sonicated phospholipid vesicles. *BBA - Biomembranes*, 690(1), 15–19. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90233-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90233-4)
- Eddlestone, S. M., Diniz, P. P. V. P., Neer, T. M., Gaunt, S. D., Corstvet, R., Cho, D., ... Breitschwerdt, E. B. (2007). Doxycycline Clearance of Experimentally Induced Chronic Ehrlichia Canis Infection in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(6), 1237–1242. <https://doi.org/10.1892/07-061.1>
- Gallego Londoño, V. (2017). *Desarrollo de un sistema de liberación controlada de doxiciclina a partir de dos prototipos de encapsulación: secado por asperción y liposomas*. Universidad de Antioquia.
- Gomes, P. S., & Fernandes, M. H. (2007). Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. *Arch Oral Biol*, 52(3), 251–259. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17141175
- Gutiérrez, L., Ocampo, L., Espinosa, F., & Sumano, H. (2014). Pharmacokinetics of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37(1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/jvp.12066>
- Gutierrez, L., Velasco, Z., Vasquez, C., Vargas, D., & Sumano, H. (2012). Pharmacokinetics of an injectable long-acting formulation of doxycycline hyclate in dogs. *Research in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-35>

- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., & Bark, H. (1998). Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: Evaluation of a 6-week course. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(7), 2140–2142.
- Holmes, N. E., & Charles, P. G. P. (2009). Safety and Efficacy Review of Doxycycline. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics*, *1*, 471–482.
- ICA. (2016). Productos medicamentos veterinarios con reg ica vigente a agosto 31 2016, (3). Retrieved from <http://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Medicamentos-Veterinarios/Medicamentos/VADEMECUM-MV-Ago-30-2016-WEB.aspx>
- Igartúa, D. E., Calienni, M. N., Feas, D. A., Chiamoni, N. S., Valle Alonso, S. Del, & Prieto, M. J. (2015). Development of Nutraceutical Emulsions as Risperidone Delivery Systems: Characterization and Toxicological Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *104*(12), 4142–4152. <https://doi.org/10.1002/jps.24636>
- Iqbal, Z., & Rikihisa, Y. (1994). Reisolation of Ehrlichia canis from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*(7), 1644–1649.
- Lam, P. L., & Gambari, R. (2014). Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.028>
- Li, Y., Huang, L., Tang, C., Zhang, E., Ding, L., & Yang, L. (2016). Preparation and characterisation of the colistin-entrapped liposome driven by electrostatic interaction for intravenous administration. *Journal of Microencapsulation*, *33*(5), 427–437. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1205153>

- Lopes De Azambuja, C. R., Dos Santos, L. G., Rodrigues, M. R., Rodrigues, R. F. M., Da Silveira, E. F., Azambuja, J. H., ... De Lima, V. R. (2015). Physico-chemical characterization of asolectin-genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. *Chemistry and Physics of Lipids*, 193, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.10.001>
- Marovac, J. (2001). [Investigation and development of new drugs: from the molecule to drug]. *Rev Med Chil*, 129(1), 99–106.
- McClure, J. C., Crothers, M. L., Schaefer, J. J., Stanley, P. D., Needham, G. R., Ewing, S. A., & Stich, R. W. (2010). Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5012–5020. <https://doi.org/10.1128/AAC.01622-09>
- Neer, T. M., Breitschwerdt, E. B., & Greene, R. T. (2002). Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM*. *Journal of Veterinary*.
- Ole-Mapenay, I. M., Mitema, E. S., & Maitho, T. E. (1997). Aspects of the pharmacokinetics of doxycycline given to healthy and pneumonic East African dwarf goats by intramuscular injection. *Veterinary Research Communications*, 21(6), 453–462. <https://doi.org/10.1023/A:1005863520483>
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1078, pp. 110–117). <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>
- Ramesh, P. J., Basavaiah, K., Divya, M. R., Rajendraprasad, N., Vinay, K. B., & Revanasiddappa, H. D. (2011). Simple UV and visible spectrophotometric methods for the determination of doxycycline hyclate in pharmaceuticals. *Journal of Analytical Chemistry*, 66(5), 482–489. <https://doi.org/10.1134/S1061934811050157>

- Ramesh, P. J., Basavaiah, K., & Rajendraprasad, N. (2010). Sensitive and selective spectrophotometric assay of doxycycline hyclate in pharmaceuticals using Folin-Ciocalteu reagent. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, *60*(4), 445–54. <https://doi.org/10.2478/v10007-010-0032-9>
- Riond, J. L., & Riviere, J. E. (1988). Pharmacology and toxicology of doxycycline. *Veterinary and Human Toxicology*, *30*(5), 431–443.
- Ruiz, S. M. A., Olvera, L. G., Chacón, S. del C. C., & Estrada, D. V. (2015). Pharmacokinetics of an oral extended-release formulation of doxycycline hyclate containing acrylic acid and polymethacrylate in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, *76*(4), 367–372. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.4.367>
- Ruz, N., Zabala, M., Kramer, M. G., Campanero, M. A., Dios-Viéitez, M. C., & Blanco-Príeto, M. J. (2004). Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography: Application to particulate drug delivery systems. *Journal of Chromatography A*, *1031*(1–2), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.028>
- Sadek, P. C. (2004). *Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography*. Wiley-Interscience.
- Senior, J. H. (1987). Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, *3*, 123–193.
- Shanmuganathan, S., Shanumugasundaram, N., Adhirajan, N., Ramyaa Lakshmi, T. S., & Babu, M. (2008). Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. *Carbohydrate Polymers*, *73*(2), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.039>
- Silva, G., Fachin, A. L., Belebony, R. O., França, S. C., & Marins, M. (2013). In vitro action of flavonoids in the canine malignant histiocytic cell line DH82. *Molecules*, *18*(12), 15448–15463. <https://doi.org/10.3390/molecules181215448>

Smith, K., & Leyden, J. J. (2005). Safety of doxycycline and minocycline: A systematic review. *Clinical Therapeutics*.
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.09.005>

Vargas-Estrada, D., Gracia-Mora, J., & Sumano, H. (2008). Pharmacokinetic study of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in calves. *Research in Veterinary Science*, 84(3), 477–482.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.07.003>

Vargas-Estrada, D., Gutiérrez, L., Juárez-Rodríguez, I., & Sumano, H. (2008). Pharmacokinetics of doxycycline and tissue concentrations of an experimental long-acting parenteral formulation of doxycycline in Wistar rats. *Arzneimittel-Forschung*, 58(6), 310–315. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296512>. Pharmacokinetics

Vargas, D., Gutierrez, L., & Gonzalez, F. (2008). Pharmacokinetics after administration of an Injectable Experimental Long-Acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in Goats. *American Journal of Veterinary Research*, 69(8), 1985–1990. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.8.1085>

Xiao, S.-Y., Zhao, L., Hart, J., & Semrad, C. E. (2013). Gastric mucosal necrosis with vascular degeneration induced by doxycycline. *The American Journal of Surgical Pathology*, 37(2), 259–63.
<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31826602d8>