

**ENSAYO PRECLÍNICO DE SEGURIDAD DE UN MICROESTRUCTURADO PARA LA
LIBERACIÓN DE DOXICICLINA EN EL TRATAMIENTO DE LA EHRlichiosis**

CANINA

Santiago Monsalve Buriticá



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

1 8 0 3

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Agrarias

Doctorado en Ciencias Veterinarias

Medellín – Colombia

2020

ENSAYO PRECLÍNICO DE SEGURIDAD DE UN MICROESTRUCTURADO PARA LA
LIBERACIÓN DE DOXICICLINA EN EL TRATAMIENTO DE LA EHRLICHIOSIS
CANINA

SANTIAGO MONSALVE BURITICÁ

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, como
requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

TUTOR

Juan David Rodas González, MV., PhD

COMITÉ TUTORIAL

Salim Mattar, Biol., PhD


Julian Londoño, Quim., PhD

Medellín – Colombia

2020

Dedicado a Ezequiel

Los verdaderos logros académicos, van inevitablemente acompañados de sacrificio, honradez y humildad. Espero que la vida se extienda en tiempo, para desquitarme con juegos y con mucho amor...

El doctorado y todos sus productos, son por y para ti, mi amor bonito. En el universo, siempre estaremos juntos. Mi razón para vivir .

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mi madre y a mis hermanos Jaime y Guto.

Al profesor Rodas quien accedió desde un comienzo a ser mi tutor sin conocerme, y que durante estos años me ha mostrado ser una de las personas más correctas y objetivas que conozco.

A la Universidad de Antioquia, y a todos los profesores del doctorado de quienes recibí conocimientos. Y en general a todas las universidades públicas de mi país, que hacen cada día un esfuerzo enorme por continuar en pie a pesar de las adversidades.

A todo el equipo de trabajo del proyecto “nanotecnología farmacéutica”. Sin ustedes nada de esto se hubiese podido realizar. Esta tesis no es el trabajo de una sola persona.

A mis exestudiantes y hoy colegas, Fredy, Azucena, Elsa, Mariana y Santiago. Esta tesis esta solventada con su esfuerzo, con sus conocimientos, con su tiempo. Fueron un apoyo enorme.

A COLCIENCIAS, convocatoria 562 - 2012 Banco de proyectos I+D+I, programa nacional de biotecnología: Programa nacional para la investigación y desarrollo de productos veterinarios. Nanotecnología farmacéutica, una estrategia de innovación, con código 127556238833, La Corporación Universitaria Lasallista, y GENTECH por la financiación del proyecto en el montaje de los ensayos de laboratorio.

A Andrés Londoño a quien admiro enormemente, su sapiencia es enorme, su paciencia una virtud.

A Juan Quintero, Esteban Arroyave, Dubán Gonzales, Ana María Muñoz, Lizeth Quintana, Karine Londoño, Sebastián Ramírez, Vanessa Gallego y Maria Victoria Álvarez por sus valiosos aportes.

Al profesor Salim Mattar y al Dr. Julián Londoño por sus aportes valiosos como comité tutorial.

A todo el grupo Centauro de la Universidad de Antioquia y al GIVET de la Corporación Universitaria Lasallista, y a todo el semillero SIVET (en especial a los veterinarios María Camila

Serna, Felipe Osorio y Diana Tofiño quienes me ayudaron de manera incansable en el manejo de los perros ingresados en el estudio).

A los profesores Daniel Aguiar, Valeria Dutra y a Luciano Nakazato (y a todo su equipo de trabajo, en especial a Anne, Ícaro, Isis, Fernanda y Mayara) de la Universidad Federal de Mato Grosso, Brasil, por su orientación y apoyo científico en algunas metodologías de esta tesis.

A todos y cada uno de los colombianos, quienes con sus impuestos aportan a los proyectos de ciencia y tecnología nacional y al financiamiento de la educación pública. Sin esto no hubiese sido posible nada de lo que está aquí plasmado y construido.

A la Corporación Universitaria Lasallista, y a todos los directivos, docentes, trabajadores y estudiantes por permitirme contar con el tiempo y la infraestructura para desarrollar el proyecto y mis estudios, por la paciencia, por creer en mí, por soportar mi carácter y caprichos.

A los albergues Hogar de Alicia y Albergue Canino del Municipio de Caldas quienes de manera cordial me permitieron acceder a los procedimientos diagnósticos en la totalidad de los ejemplares.

A Donna (y a su nuevo dueño Moisés); y a Guardián, Negra, Cloi y Caliche, quienes se comportaron durante el proceso supremamente bien facilitándome el estudio.

Dedicado a todos los veterinarios faunólogos colombianos y latinoamericanos.

A Esparza y Carlos por la amistad vitalicia, y compañía fraterna en la distancia.

A Alexandra Asanovna Elbakyan por su promoción incansable del conocimiento libre en todas las esferas.

A Elvis y Mía, por todo su acompañamiento y sincero amor correspondido, cálido y desinteresado, propio de su especie, en todos estos años de estudio.

Y por supuesto, a la memoria de mi padre; de quien su muerte, sigo aún sin reponerme.

Tabla de contenidos

Tabla de contenidos.....	VI
Abreviaturas.....	IX
Lista de Tablas.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Resumen	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Capítulo I	7
Farmacocinética y efectos adversos de la doxiciclina en el tratamiento de la ehrlichiosis: Fundamentos teóricos para ensayos clínicos en caninos.	7
Introducción	7
Aspectos generales y fundamentos básicos de los ensayos preclínicos y de fase I	8
Diseño	8
Importancia de los ensayos preclínicos y de fase I para la evaluación de nuevas formulaciones	9
Doxiciclina	10
Parámetros para el estudio de la farmacocinética de la doxiciclina, y su relación con posibles efectos adversos	11
Absorción	12
Distribución	14
Eliminación	15
<i>Ehrlichia canis</i>	16
Indicadores de la circulación de <i>Ehrlichia</i> spp. en ejemplares caninos en Colombia	19
Genotipos	22
Fases de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME)	22
Respuesta inmune a la enfermedad	24
Protocolo de tratamiento contra CME	26
Doxiciclina como tratamiento de elección	28
Perspectivas terapéuticas de los microencapsulados	29
Contexto nacional en la reglamentación de nuevas formulaciones	30
Conclusiones	31
Referencias	31

Capítulo II	47
Análisis farmacocinético de un microencapsulado para la liberación de doxiciclina en el biomodelo canino sano e infectado naturalmente con <i>Ehrlichia canis</i>	47
Introducción	47
Metodología	48
Aspectos éticos	48
Elaboración de microencapsulados	49
Determinación de la cantidad de doxiciclina en microencapsulado	50
Sitios de estudio y toma de muestras	50
Perfil farmacocinético de una formulación oral microencapsulada para la liberación de doxiciclina (Formicrodox) en ejemplares caninos sanos (con suministro de alimentos y en ayuno)	51
Perfil farmacocinético de una formulación oral microencapsulada para la liberación de doxiciclina (Formicrodox) en el tratamiento de la CME.	55
Resultados	59
Elaboración del microencapsulado	59
Ensayo piloto de seguridad	60
Ensayo preclínico de seguridad	67
Discusión	72
Ensayos preliminares con una sola intervención (ensayo piloto)	72
Ensayo paralelo longitudinal en el manejo de la CME (Estudio preclínico de seguridad)	77
Conclusiones	81
Referencias	82
Capitulo III	91
Seguridad de un Microencapsulado para la Liberación de Doxiciclina en el Tratamiento de la Ehrlichiosis Monocítica Canina	91
Introducción	91
Metodología	92
Aspectos éticos	92
Diseño del ensayo clínico de seguridad	93
Criterios de inclusión	93
Criterios de exclusión	93
Reclutamiento de los ejemplares caninos a intervenir	94
Ensayo preclínico de seguridad	99
Desenlaces	101

Estrategias de adherencia y exclusión de ejemplares durante el estudio.....	105
Resultados.....	106
Reclutamiento: Análisis molecular.....	106
Análisis filogenético	108
Ensayo preclínico de seguridad.....	109
Desenlace primario: Eventos de vómito durante el tratamiento.....	111
Desenlace secundario. Cambios en parámetros sanguíneos.....	111
Desenlace terciario. Equivalencia de efectos bacteriostáticos.....	115
Discusión	119
Reclutamiento.....	120
Desenlace primario	120
Desenlace secundario	122
Desenlace terciario	124
Limitaciones	126
Conclusiones	127
Referencias.....	127
Conclusiones generales.....	¡Error! Marcador no definido.

Abreviaturas

MIC: Concentración mínima inhibitoria

CME: Ehrlichiosis monocítica canina

AUC: Área bajo la curva

Cmax: Concentración máxima

t_{1/2}: Tiempo de vida media

Tmax: Tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima del fármaco en la sangre

Formicrodox: Formulación microencapsulada de doxiciclina

LD: Límite de detección

CMC: Carboximetil celulosa de sodio

BPM: Buenas prácticas de manufactura

Lista de Tablas

Tabla 1 Ensayo piloto: Características basales y posteriores a las intervenciones en caninos sanos	60
Tabla 2 Parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis no compartimental en dos ejemplares caninos. Estudio cruzado con dos periodos de tiempos a una dosis de 10 mg/Kg de doxiciclina	62
Tabla 3 Promedios de la desviación estándar de detección de doxiciclina sérica (UPLC-MS/MS) en los ejemplares, de manera individual, y por tratamientos instaurados. Estudio cruzado con dos periodos de tiempo y un periodo de lavado de 20 días, 10 mg/Kg oral de doxiciclina	63
Tabla 4 Parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis no compartimental en dos ejemplares caninos. Estudio paralelo en un periodo de tiempos a una dosis de 10 mg/Kg de doxiciclina	65
Tabla 5 Ensayo preclínico: Características basales de los ejemplares caninos con CME reclutados para el estudio.	67
Tabla 6 Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$) Formicrodox (azul) Vs Control (rojo) en ejemplares caninos con CME; y diferencias entre la concentración de doxiciclina para los tratamientos	69
Tabla 7 Parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis no compartimental en ejemplares caninos con CME. Estudio paralelo (Formicrodox Vs Control) por 28 días a una dosis de 10 mg/Kg de doxiciclina al día	71
Tabla 8 Parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis bicompartimental en ejemplares caninos con CME. Estudio paralelo (Formicrodox Vs Control) por 28 días a una dosis de 10 mg/Kg al día de doxiciclina	71
Tabla 9 Ensayo preclínico: características basales de los caninos tratados durante 28 días	109
Tabla 10 Valores hematológicos durante el estudio preclínico	112
Tabla 11 Significancia estadística de valores hematológicos durante el estudio	114
Tabla 12 Valores del número de copias calculadas de DNA por ml de sangre.....	118

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de la doxiciclina.	11
Figura 2. Origen, transmisión y patogenia de <i>Ehrlichia canis</i> sobre un monocito.	18
Figura 3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las micropartículas. Doxiciclina recubierta por sacarosa, gelatina y CMC, obtenidas por secado por aspersión.....	40
Figura 4. Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$). Formicrodox Vs Control en dos ejemplares caninos durante 120 horas sin ayuno.	63
Figura 5. Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$) Formicrodox Vs Control en dos ejemplares caninos durante 120 horas, de manera independiente sin ayuno.	64
Figura 6. Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$) Formicrodox Vs Control en dos ejemplares caninos durante 120 horas en condiciones de ayuno.	66
Figura 7. Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$) Formicrodox Vs Control en ejemplares caninos durante 28 días en el manejo de la CME.	68
Figura 8. Plásmido de 3139 pb, con ligación de un fragmento del gen 16S rRNA	105
Figura 9. Amplicones de PCR para el cebador 16S rRNA, los cuales habían salido positivos para el marcador EC16S por qPCR.	107
Figura 10. Amplicones de PCR para el cebador Dsb, los cuales habían salido positivos para el marcador EC16S por qPCR.	107
Figura 11. Árbol filogenético realizado por el método Neighbor-Joining con el gen 16S rRNA específico de la familia Anaplasmataceae.....	108
Figura 12. Árbol filogenético realizado por el método Neighbor-Joining con el gen Dsb de Ehrlichia..	109
Figura 13 y Figura 14. Curvas de calibración estándar y de disociación por qPCR para Ehrlichia con el plásmido ligado.....	117

- Figura 15.** Curva de calibración estándar con el plásmido que contiene un fragmento del gen 16S rRNA, obtenidos con los cebadores EC16SF y EC16SR 117
- Figura 16.** Cinética de copias de DNA de Ehrlichia canis (16S rRNA) por qPCR en sangre de perros tratados durante los primeros 3 días de tratamiento..... 119

Resumen

La doxiciclina es el antibiótico de elección en caninos para el tratamiento de la ehrlichiosis monocítica (CME). Aunque el fármaco es considerado seguro, no está exento de reacciones adversas. Estos efectos indeseables están relacionados con sus propiedades irritantes (gastrolesividad principalmente con presencia de vómito). El objetivo general de esta tesis fue describir la farmacocinética y demostrar la seguridad de una nueva formulación microencapsulada para la liberación de doxiciclina en el biomodelo canino (Formicrodox).

Para dicho fin se estudió inicialmente la cinética, por medio de dos ensayos piloto (cruzado sin ayuno, y paralelo en ayunas) en ejemplares considerados sanos; y posteriormente se realizó un ensayo preclínico en pacientes con CME (estudio explicativo de grupos paralelos de equivalencia: Formicrodox vs. control, unicéntrico, triple ciego y con asignación aleatoria) en donde fue medido, durante 28 días, el número de eventos de vómito como desenlace primario, cambios hematológicos como desenlace secundario e inferencia bacteriostática como desenlace terciario.

En los estudios piloto y preclínico, se logró obtener valores por encima de la concentración mínima inhibitoria (MIC) establecida para el manejo de CME. En las intervenciones de animales sanos, no se presentaron para los dos procesos (con ingesta de alimentos y en ayuno) diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p=0,453$ y $p=0,262$ respectivamente). El parámetro $AUC_{0-24}:MIC$, en los dos ensayos piloto, se encontraron por encima de 215. Para el estudio preclínico no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,843$) entre la formulación innovadora y el grupo control, y el valor $AUC_{0-24}:MIC$ obtenido en este ensayo fue de 791,05 y 1789,6 respectivamente.

Para en estudio preclínico de seguridad en perros enfermos con CME, cinco (5/198) ejemplares cumplieron con los criterios de inclusión, y cuatro fueron reclutados por medio de asignación por bloques balanceados. En el estudio de seguridad se presentaron 3 eventos de vómito durante los 28 días de tratamiento, tanto en el grupo microencapsulado como para el grupo control ($p=1.0$). Luego de comparar la diferencia entre tratamientos, la interacción entre el tratamiento y los tiempos de estudio, y el valor inicial y final de los parámetros hematológicos obtenidos; se determinó una diferencia estadística entre el valor inicial de plaquetas ($p=0,022$) y proteínas plasmáticas ($p=0,03$) en comparación con el valor final. Todos los datos hematológicos para el último día de la intervención se encontraron en los rangos considerados normales para la especie en los dos grupos estudiados. En el desenlace terciario se evidenció un descenso de manera constante de copias de DNA de *Ehrlichia canis* (16S rRNA) durante las primeras 48 horas de tratamiento en los dos grupos, donde apenas fue perceptible la amplificación del gen por encima de la línea Ct por qPCR.

El estudio demostró que el microencapsulado no tuvo diferencias significativas con la doxiciclina hiclato comercial como control, respecto al comportamiento farmacocinético e indicadores de seguridad. Se deben realizar estudios clínicos que puedan ser llevados a cabo en un mayor número de ejemplares caninos y que confirmen la eficacia y eficiencia de esta estrategia innovadora, con el fin de considerar el microencapsulado estudiado, en un escenario comercial a futuro.

Abstract

Doxycycline is the antibiotic of choice for dogs for the treatment of monocytic ehrlichiosis (CME). Although this drug is considered to be safe, it is not free of adverse reactions. These undesirable effects are related to its irritant properties (principally gastrolesivity with the presence of vomiting). The general objective of this thesis is to describe its pharmacokinetics and to demonstrate the security of a new formulation microencapsulated for the liberation of doxycycline in the canine biomodel (Formicrodox).

Toward this stated aim, kinetics were studied through two pilot tests (crossed without fasting, and parallel with fasting) on healthy canine exemplars, followed by a preclinical test (explanatory study of parallel equivalent groups: Formicrodox vs. control), unicentric, triple blind with a random design) in which the number of vomiting events were measured over a period of 28 days as a primary outcome, hematological changes were measured as a secondary outcome, and bacteriostatic inference was measured as a tertiary outcome.

In pilot and preclinical studies, values were obtained that were above the minimum inhibitory concentration (MIC) established for the management of CME. In healthy animal interventions, they were not found for either of the two processes (with ingestion of foods and during fasting), with statistically significant differences between the two treatments ($p=0.453$ and $p=0.262$, respectively). The parameter $AUC_{0-24}:MIC$ was found to be above 215 in the two pilot trials. For the preclinical study, statistically significant differences were not obtained ($p=0.843$) between the innovative formulation and the control group, and the $AUC_{0-24}:MIC$ values obtained in this test were 791.05 and 1789.6, respectively.

For the preclinical study of safety in dogs ill with CME, five (5/198) exemplars met the criteria of inclusion and four were recruited through the assignation of balanced blocks. In this safety study, 3 vomiting events presented during 28 days of treatment in the microencapsulate group, as well as in the control group ($p=1.0$). After comparing the difference between treatments, the interaction between treatments and study times, and the initial and final values of the hematological parameters obtained, it was determined that a statistical difference was found between the initial plaque value ($p=0.022$) and plasma proteins, ($p=0.03$), as compared to the final value. All of the hematological data for the last day of the intervention were found within ranges considered to be normal for the species in the groups studied. In the tertiary outcome, a constant decline in copies of the DNA of *Ehrlichia canis* (16S rRNA) was found during the first 48 hours of treatment in the two groups, in which the amplification of the gene above the Ct line for qPCR was barely perceptible.

This study demonstrated that the microencapsulate did not present significant differences with the commercial doxycycline hyclate as a control with respect to pharmacokinetic behavior and security indicators. Clinical studies must be done that can be implemented for a larger number of canine exemplars and that confirm the efficacy and the efficiency of this innovative strategy with the goal of considering the microencapsulate studied for its future in the commercial arena.

Introducción

Ehrlichia canis es el patógeno causante de la Ehrlichiosis monocítica canina (CME). Esta enfermedad fue reportada en el año 1935 en Argelia a partir de experimentos realizados con perros. El agente descrito por Donatein y Lestoquard en el año 1935 fue llamado en un inicio *Rickettsia canis*. Posteriormente, fue renombrado en el año 1945 como *Ehrlichia canis* en honor al bacteriólogo alemán Paul Ehrlich. En la década del 60, muchos ejemplares caninos militares de raza pastor alemán, que estuvieron en la guerra de Vietnam, sufrieron síntomas caracterizados por hemorragias y emaciación, con una elevada mortalidad. La etiología le fue atribuida a la bacteria *Ehrlichia canis* y la enfermedad fue llamada Pancitopenia Tropical Canina. Desde entonces, este microorganismo de la familia Anaplasmataceae ha sido considerado el causante de una de las dolencias infecciosas más comúnmente detectadas en perros, principalmente localizados a nivel del trópico. Finalizando el siglo 20, varios autores reportaron en sus investigaciones, el potencial bacteriostático que tiene la familia de las tetraciclinas en el tratamiento de los microorganismos del orden Rickettsiales. En perros, la doxiciclina (fármaco incluido en esta familia) es el antibiótico de elección para pacientes con CME, debido a su mecanismo de acción, propiedades antibacterianas, y a que, hasta la fecha, no han sido reportados mecanismos de resistencia por parte del patógeno a las tetraciclinas. Durante años, el protocolo terapéutico fue establecido a una dosis de 10 mg/Kg al día, durante 14 a 21 días. Sin embargo, en el año 2002, Neer y colaboradores (Grupo de estudio de enfermedades infecciosas del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria - ACVIM), plantearon la necesidad de extender la administración oral por 28 días. Este cambio de paradigma pudo haber logrado mejorar la respuesta al tratamiento, sin embargo, por las características físico-químicas de las tetraciclinas, la presencia de efectos indeseables fue habitualmente reportada (principalmente efectos gastrolesivos, esofagitis y efectos por quelación

del calcio). En el año 2011, Shultz y colaboradores demostraron, por medio de un estudio retrospectivo, que el efecto secundario más comúnmente reportado en perros tratados con doxiciclina era el vómito (18,3%). En la actualidad se viene presentando un auge en el desarrollo de productos microencapsulados, que han logrado adaptar nuevas formas farmacéuticas de antibióticos, y han permitido obtener mejores indicadores de seguridad, gracias a la liberación de los principios activos por medio de mecanismos controlados. Debido a esta problemática, y a las nuevas perspectivas en el área de la biotecnología, un equipo de trabajo interdisciplinario (grupos de investigación GIVET y GAMA adscritos a la Corporación Universitaria Lasallista), diseñó y desarrolló un sistema de liberación controlada de doxiciclina a partir de un prototipo de encapsulación (utilizando carboximetil celulosa, azúcar y gelatina) por medio del método de secado por aspersión (spray drying) (Gallego-Londoño, 2017), y probado de manera preliminar en líneas celulares DH82 (Mazabel-Riera, 2017).

La tesis está compuesta de tres capítulos: el primero es una revisión de tema en el cual se describe el estado del arte de la farmacocinética y efectos adversos de la doxiciclina en el tratamiento de la ehrlichiosis para ensayos clínicos en caninos, el segundo es un análisis farmacocinético de un microencapsulado para la liberación de doxiciclina en el biomodelo canino sano (luego de la ingesta de alimentos y en ayunas), e infectado naturalmente con *Ehrlichia canis*; y en el tercero se demuestra la seguridad de un microencapsulado para la liberación de doxiciclina en el tratamiento de la ehrlichiosis monocítica canina.

Capítulo I

Farmacocinética y efectos adversos de la doxiciclina en el tratamiento de la ehrlichiosis:

Fundamentos teóricos para ensayos clínicos en caninos.

Introducción

Las tetraciclinas han sido utilizadas ampliamente desde su descubrimiento en 1953 cuando fue comercializada por primera vez por Lederle Laboratorios. Durante muchos años, estos antibióticos fueron la primera opción en el tratamiento sistémico del acné en pacientes humanos (Smith & Leyden, 2005). Con el tiempo las dificultades que representaba la ingesta de 4 dosis al día, y la necesidad de tomarla en ayunas para que cumpliera un buen efecto bacteriostático, llevó al desarrollo de antibióticos sintéticos, empezando con la producción y comercialización de la doxiciclina en 1967 (Barza & SchieFe, 1977; Nelson & Levy, 2011).

La doxiciclina es considerado el fármaco de elección para el tratamiento de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME) (T. Neer, Breitschwerdt, Greene, & Lappin, 2002). La CME es una enfermedad infecciosa canina causada por la bacteria *Ehrlichia canis*, la cual es transmitida principalmente por garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Keefe, Holland, Salyer, & Ristic, 1982). El género *Ehrlichia* es clasificado dentro del orden Rickettsiales y familia Anaplasmataceae (Dumler et al., 2001) y se caracterizan por ser organismos intracelulares obligados, pleomórficos, con frecuencia esferoide u ovoide, que se establecen en monocitos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas, produciendo mórulas intracitoplasmáticas, la infección dentro del animal se disemina vía sanguínea o linfática dentro de las células mononucleares infectadas (T Waner et al., 2001). A pesar de ser considerado el fármaco de elección, la doxiciclina causa una amplia gama de efectos indeseables en pacientes caninos con CME debido a las altas dosis y

tiempos prolongados que se requieren para el cumplimiento del protocolo bacteriostático con el fin de combatir esta enfermedad. Esta revisión presenta los aspectos farmacocinéticos y posibles efectos adversos relacionados con el uso de la doxiciclina en el tratamiento de la CME.

Aspectos generales y fundamentos básicos de los ensayos preclínicos y de fase I

Los ensayos clínicos son de carácter prospectivo, y por el número de observaciones sucesivas realizadas durante el periodo de estudio, son catalogados como longitudinales. Generalmente, incluyen poblaciones homogéneas que puedan ser comparables en cuanto a su condición de enfermedad y características biológicas (Lazcano-Ponce et al., 2004). Inicialmente, en la evaluación toxicológica de nuevas sustancias, se emplean baterías de ensayos en diferentes sistemas, que comprenden modelos experimentales *in vitro* (cultivos y líneas celulares) e *in vivo* (biomodelos alternativos y/o un reducido número de animales). Las mismas abarcan diferentes dianas, que van desde la toxicidad intrínseca de la sustancia evaluada, hasta la evaluación de sus posibles efectos tóxicos en los diferentes sistemas y órganos. La valoración armónica de los resultados de estos estudios permite llegar a un criterio más integral de la toxicidad de nuevas formulaciones y sus posibles consecuencias (Gámez & Más, 2007).

Diseño

El diseño experimental clásico de los ensayos clínicos tiene ciertas características que lo definen.

a. Control de las condiciones bajo estudio (selección de los sujetos, la manera como el tratamiento es administrado, la forma en la que las observaciones son obtenidas, los instrumentos usados para realizar las mediciones, entre otras).

- b. Definición clara de la intervención bajo estudio y al menos un grupo control.
- c. Asignación aleatoria a los grupos de intervención, por lo tanto, en los estudios triple ciego, ningún investigador, clínicos participantes, o sujetos de estudio, deben interferir por sí mismos en la decisión del tratamiento que ellos recibirán.
- d. Estratificación de la población de sujetos de estudio en subgrupos, por diversos factores, como edad, sexo, grupo étnico y condición clínica estudiada.
- e. Definición y cuantificación de los desenlaces (outcome), antes y después de haber recibido la intervención (Alfonso, Guerrero, & Lorenzana-Jiménez, 2009; Lazcano-Ponce et al., 2004).

Importancia de los ensayos preclínicos y de fase I para la evaluación de nuevas formulaciones

Los ensayos preclínicos, dentro del tamizaje toxicológico inicial en el estudio de nuevas formulaciones, permiten detectar alteraciones de las funciones celulares básicas, debido a la exposición a un compuesto (Gámez & Más, 2007; Straughan, Fentem, & Balls, 1997). La selección de los diferentes ensayos, especies, tiempo, vías de exposición y dosis a emplear, estarán en dependencia de las características propias de la sustancia estudiada, y de los objetivos de su posible uso (medicina humana o veterinaria) (Gámez & Más, 2007).

Para evaluar una nueva formulación, los objetivos principales de los ensayos preclínicos y de fase I, comprenden el estudio de la seguridad al valorar la presencia de efectos indeseables. Estos estudios determinan la tolerabilidad al establecer los límites probables de valores de dosis clínicas seguras; y estudian la farmacocinética al valorar la absorción, distribución, metabolismo y

excreción del fármaco. En ocasiones, en los ensayos clínicos de fase I, las pruebas son realizadas en individuos enfermos, y no es ético exponer a voluntarios sanos a posibles efectos tóxicos predecibles (Alfonso et al., 2009). Los ensayos preclínicos y de fase I, están diseñados para determinar las acciones farmacológicas, el metabolismo de las drogas, así como los posibles mecanismos de acción, las reacciones adversas asociadas con las dosis, y si es posible, obtener evidencia temprana de su efectividad. De igual manera, también incluyen estudios en los que los nuevos agentes farmacológicos son utilizados como herramientas de investigación para explorar fenómenos biológicos o en el proceso de enfermedad. Durante esta fase se cuantifican ampliamente los efectos farmacocinéticos y de seguridad que permitirían planear las fases subsiguientes (Alfonso et al., 2009; Lazcano-Ponce et al., 2004).

Doxiciclina

Los primeros intentos que se realizaron al tratar de modificar la estructura química de las tetraciclinas se vieron obstaculizados por la inestabilidad inherente a los compuestos. El descubrimiento en la década de 1950 del grupo 6-hidroxilo, dio paso en 1962 (gracias al trabajo de Schach Von Wittenau y colaboradores) a la posibilidad de remover dicha estructura de estos antibióticos (Nelson & Levy, 2011), dando como resultado una molécula de 6-deoxitetraciclina con propiedades farmacocinéticas e incremento en la actividad antibacteriana en comparación con la familia precursora (Cunha, Sibley, & Ristuccia, 1982; Von Wittenau, Beereboom, Blackwood, & Stephens, 1962). La doxiciclina puede ser sintetizada por diferentes procesos. Esta puede ser aislada como sal hidrocloreto solvatada. La doxiciclina hclato es la abreviación de doxiciclina clorhidrato hemietanolato hemihidrato (Cunha et al., 1982). La doxiciclina es considerado un

antibiótico de segunda generación (Saivin & Houin, 1988) que en términos de estructura se puede distinguir de las originales tetraciclinas por sustituciones en las posiciones 5 y 6 (Figura 1).

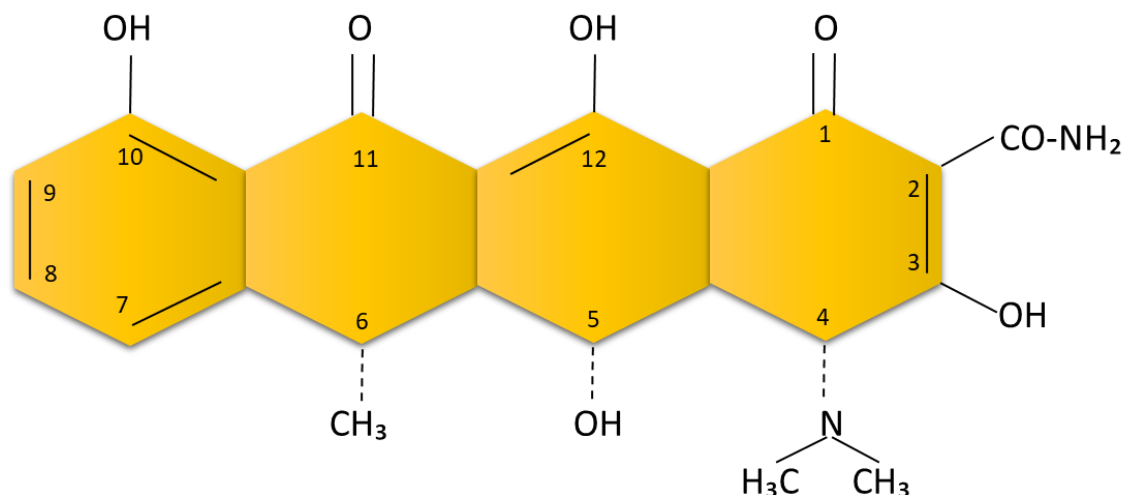


Figura 1. Estructura química de la doxiciclina.

Parámetros para el estudio de la farmacocinética de la doxiciclina, y su relación con posibles efectos adversos

La absorción, distribución y eliminación de la doxiciclina dependen de factores tales como el tamaño de partícula, coeficiente de partición de lípidos/tampón, acople a proteínas plasmáticas, acidez de los medios biológicos, exposición a cationes multivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) y el nivel de expresión de la P-glicoproteína (P-gp) en las membranas celulares que enfrentan. En particular, su lipofilia es bastante diferente a la de las tetraciclinas, la doxiciclina tiene un coeficiente de partición más alto (0.63) en comparación con las tetraciclinas (0,102). La mayor lipofilia le permite un mayor paso por las membranas biológicas, lo que facilita

la penetración en tejidos corporales (Barza & SchieFe, 1977; Fourtillan & Saux, 1977; Riond, Vaden, & Riviere, 1990; Saivin & Houin, 1988).

Absorción

El proceso de absorción comprende los mecanismos de liberación del fármaco de su forma farmacéutica, su disolución, la entrada al organismo desde el lugar de administración, los mecanismos de transporte y la eliminación presistémica, así como las características de cada vía de administración, la velocidad, la cantidad de fármaco que accede a la circulación y los factores que puedan alterarla (Armijo, 2003). La doxiciclina por tener un coeficiente de partición alto cuenta con una mayor solubilidad en lípidos, esto explica su absorción superior en comparación con otras tetraciclinas después de una administración oral, característica útil para una buena distribución hacia los tejidos (exceptuando el líquido cefalorraquídeo) (Barza & SchieFe, 1977; Deck & Winston, 2012; Fourtillan & Saux, 1977; Riond et al., 1990; Saivin & Houin, 1988). La doxiciclina presenta una mayor absorción por vía oral con rangos que oscilan entre el 90% y el 100% de biodisponibilidad debido a su alta liposolubilidad, sin embargo esto tiene como inconveniente la unión en mayor medida a proteínas plasmáticas (principalmente a la albúmina) (Del Castillo, 2013) en comparación con otras tetraciclinas (Lemos, 2002). Esta puede estar cercana entre un 82 a un 93% (Agwuh & MacGowan, 2006), lo cual representa un problema para poder mantener concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), ya que los fármacos que se fijan fácilmente a las proteínas, pueden reducir su capacidad de acción que es exclusiva de la fracción libre (Chambers, 2007). La doxiciclina también se ha asociado a la unión con transferrina en su fracción β -globulina en humanos (Bocker, Muhlberg, Platt, & Estler, 1986). Desde el punto de vista terapéutico, una alta biodisponibilidad no siempre es lo más apropiado ya que una mayor

absorción podría asociarse con un incremento en la aparición de efectos adversos, pues como premisa farmacocinética lo deseable de un fármaco es que mantenga niveles séricos adecuados durante tiempos prolongados (Armijo, 2003).

Las tetraciclinas en general, en disolución, suelen ser más estables frente al PH ácido, y en su mayoría se comportan como anfóteros, por lo tanto pueden actuar como aniones (formando sales de sodio) o como cationes (como clorhidratos) (Lemos, 2002). La absorción ocurre principalmente en el intestino delgado superior (Deck & Winston, 2012) y al entrar en contacto con la dieta se puede dar una interacción por la formación de precipitados insolubles que pueden llegar a causar una reducción en la cantidad del antibiótico que se absorbe debido a la presencia de cationes divalentes tales como Ca^{+2} , Mg^{+2} y Fe^{+2}) (Lemos, 2002). A pesar de esto, se ha reportado que la absorción de doxiciclina, a diferencia de otras tetraciclinas, no se ve significativamente afectada por los efectos de quelación luego de un tratamiento en conjunto con la ingesta de alimentos (Kukanich & Kukanich, 2015; Saivin & Houin, 1988; Saux, Mosser, Pontagnier, & Leng, 1983). Los cationes divalentes son elementos considerados bajos en la dieta y en consecuencia la interacción con las tetraciclinas no ha sido considerada representativa (Armijo, 2003; Carou, Font, & Jover, 1999; Deck & Winston, 2012). A pesar de esto se ha reportado que algunos parámetros farmacocinéticos como la biodisponibilidad y el área bajo la curva (AUC) podrían verse afectados (hasta un 20%) cuando el antibiótico es suministrado en conjunto con alimentos (Agwuh & MacGowan, 2006; Del Castillo, 2013; Saux et al., 1983), esto podría ser inconveniente debido a la imposibilidad de cumplir con las concentraciones mínimas inhibitorias en la gama de patógenos sensibles.

La concentración de doxiciclina sérica requerida, en el tratamiento de CME, debe permanecer por encima de niveles superiores a 0,03 µg/ml (Branger, Rolain, & Raoult, 2004), durante 28 días (T. M. Neer, Breitschwerdt, Greene, & Lappin, 2002).

Distribución

La cinética de absorción cuantifica la entrada de fármaco en la circulación sistémica y engloba los procesos de liberación del fármaco de su forma farmacéutica, disolución, absorción propiamente dicha y eliminación presistémica. La distribución incluye el estudio de la velocidad de absorción, de la cantidad absorbida y de los factores que la alteran (Armijo, 2003). En términos generales, luego de empezar el proceso de absorción de doxiciclina se pueden encontrar trazas en sangre después de 15 minutos de administración oral (Saivin & Houin, 1988) con un volumen de distribución en promedio de 0,7 l/Kg, y con una concentración máxima (Cmax) detectable entre las 2 y 3 horas después de ser administrada en humanos (Agwuh & MacGowan, 2006). Las características lipofílicas y el alto volumen de distribución de la doxiciclina facilita una amplia distribución por todo el organismo que permite la acumulación en diversos tejidos (Vicente & Pérez-Tallero, 2010). La doxiciclina es clasificada dentro del grupo de la familia de las tetraciclinas como fármaco de acción prolongada, por presentar un largo tiempo de vida media, con una semivida promedio de 10.36 horas en perros (Wilson, Kemp, Kitzman, & Goetsch, 1988) y entre 16 a 18 horas en humanos (Deck & Winston, 2012; Perez-Trallero & Iglesias, 2003; Vicente & Pérez-Tallero, 2010).

Eliminación

La eliminación de la doxiciclina se realiza principalmente a través de la bilis a diferencia de las otras tetraciclinas las cuales tienen, como mecanismo de excreción, la vía renal (Lemos, 2002). Su eliminación por vía urinaria es muy escasa (30 - 42%) (Fourtillan & Saux, 1978; Perez-Trallero & Iglesias, 2003; Saivin & Houin, 1988) y por lo tanto la doxiciclina, en contraste con otras tetraciclinas, no se acumula de manera significativa y no requiere un ajuste de la dosis en casos de insuficiencia renal (Deck & Winston, 2012; Perez-Trallero & Iglesias, 2003). La doxiciclina puede atravesar la barrera placentaria, y de igual manera puede ser eliminada por la leche. En el feto, las concentraciones alcanzan niveles similares a las séricas maternas (Del Castillo, 2013). No se ha determinado la relación entre niveles terapéuticos con doxiciclina, e indicadores de teratogenicidad (Cross et al., 2016; Czeizel & Rockenbauer, 1997). Las tetraciclinas se someten a la circulación entero-hepática y gran parte del fármaco excretado en la bilis se reabsorbe en el intestino, este proceso contribuye a expandir su tiempo de vida media (Del Castillo, 2013). En el caso de la doxiciclina, las concentraciones hepáticas pueden alcanzar datos similares a las concentraciones séricas, mientras que la bilis puede contener una concentración 11 veces mayor (Fourtillan & Saux, 1977; Saivin & Houin, 1988), sin embargo se han reportado concentraciones 25 veces superiores en bilis que en suero (Agwuh & MacGowan, 2006). Una vez la doxiciclina ha alcanzado la luz intestinal, una parte de esta es quelada con Ca^{2+} , Mg^{2+} . La doxiciclina no quelada se reabsorbe gracias al reciclaje entero-hepático (Saivin & Houin, 1988).

El aclaramiento renal en ejemplares caninos normalmente se encuentra en valores cercanos a $1,68 \pm 0,44$ ml/min/Kg (Wilson et al., 1988), este dato es similar en humanos (Fourtillan & Saux, 1977; Saivin & Houin, 1988). El pH de la orina puede cambiar la difusión de la doxiciclina en el tejido

renal, por lo tanto una orina acidificada aumenta las concentraciones en este tejido, mientras que una alcalinización favorece el aclaramiento renal (Saivin & Houin, 1988; Welton, 1980).

Ehrlichia canis

Ehrlichia canis fue la primera especie del género *Ehrlichia* reconocida y, desde su descubrimiento en Argelia en 1935 por Donatien y Lestoquard, ha sido identificada en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Dolz et al., 2013; Donatien & Lestoquard, 1937; Little, 2017). Denominada inicialmente como *Rickettsia canis*, cobró importancia durante la guerra de Vietnam por causar la muerte a cientos de perros militares (Dolz et al., 2013; Keefe et al., 1982). *Ehrlichia canis* es una bacteria altamente pleomórfica envuelta en dos membranas fosfolipídicas (Shimon Harrus & Waner, 2011; Hildebrandt, Conroy, Nyindo, & Huxsoll, 1973; Rikihisa, Perry, & Cordes, 1985; Rikihisa et al., 1997), y cuenta con un material genético acoplado dentro de un cromosoma simple circular que contiene 1,315,030 nucleótidos (Harrus & Waner, 2011; Mavromatis et al., 2006). Esta bacteria se replica dentro de una vacuola derivada de la membrana de la célula eucariota del hospedero, vertebrado o invertebrado (Harrus & Waner, 2011), principalmente dentro de los monocitos (Figura 2). La CME es considerada la enfermedad infecciosa de tipo bacteriana más común encontrada en la casuística veterinaria en ejemplares caninos del trópico. Actualmente se discute su importancia como agente con potencial zoonótico, debido a la detección de infección en humanos de Venezuela con y sin asociación de signos clínicos (Perez, Bodor, Zhang, Xiong, & Rikihisa, 2006; Perez, Rikihisa, & Wen, 1996), y posible evidencia serológica y molecular en humanos de Argentina (Ripoll et al., 1999), Brasil (Calic et al., 2004; Labruna et al., 2007), Colombia (Hidrón, Muñoz, & Vega, 2014; Rios, Franco, Mattar, Urrea, & Tique, 2008) y Costa Rica (Bouza-Mora et al., 2017). En caninos, la patogénesis de la enfermedad depende de

varios factores como la cantidad del inóculo, el genotipo, el estado inmunológico y la presencia de coinfecciones. No existe predilección de edad o sexo, sin embargo ha sido reportado que ejemplares de la raza pastor alemán podrían tener una mayor susceptibilidad y un peor pronóstico en comparación con otras razas (Little, 2010, 2017). La CME es transmitida principalmente por garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Keefe et al., 1982). La transmisión de *Ehrlichia canis* en las garrapatas se da por vía transestadial, pero no ocurre por vía transovárica, con lo cual, la bacteria es adquirida solamente al alimentarse sobre un hospedador infectado (Cicuttin, De Salvo, Silva, Brito, & Nava, 2017). La infección del hospedero vertebrado, que incluyen miembros de la familia Canidae como el coyote, zorro, chacal y el perro doméstico, ocurre cuando el ectoparásito infectado ingiere sangre del macro-vertebrado y con sus secreciones salivales contamina el sitio de ingestión; además de la transmisión por transfusiones de sangre de donadores infectados con el patógeno (Dumler et al., 2001; Little, 2010, 2017).

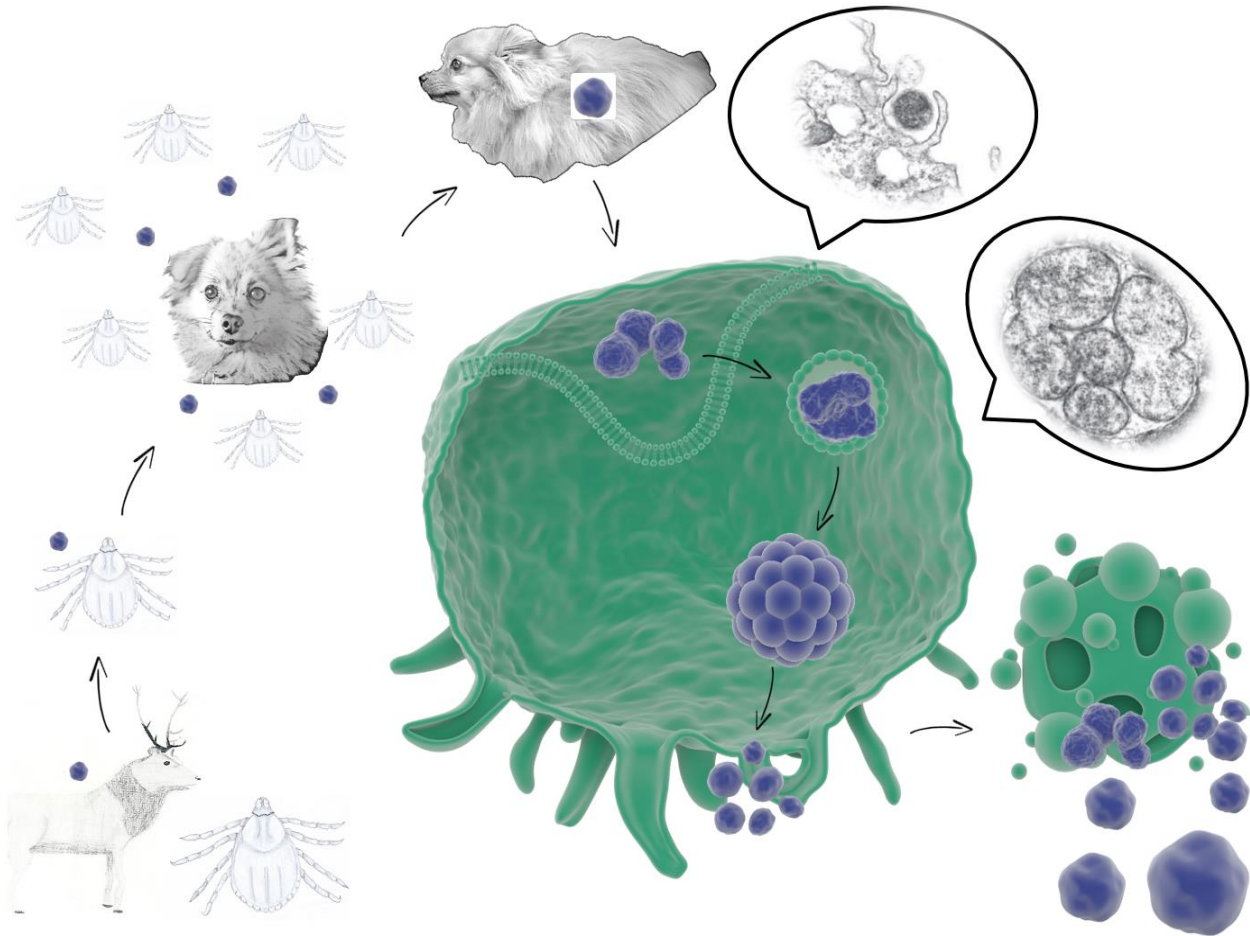


Figura 2. Origen, transmisión y patogenia de *Ehrlichia canis* sobre un monocito. Cuando el canino entra en contacto con los vectores (a través de la picadura), por la convivencia o la exposición accidental con reservorios, se puede adquirir la enfermedad. *Ehrlichia canis* ingresa por endocitosis al monocito, formando un fagolisosoma donde entra en replicación, dando como resultado la conformación de la mórula típica; y por exocitosis las nuevas bacterias llegan a la circulación repitiéndose el ciclo. Adaptación (Little, 2010; Rikihisa, 2010).

Indicadores de la circulación de *Ehrlichia* spp. en ejemplares caninos en Colombia

La detección en ejemplares caninos serológica y molecular del género *Ehrlichia* spp. en Colombia, ha sido descrita en diferentes regiones. Sin embargo, debido a la complejidad geográfica del país, y al uso de diversas metodologías clínicas utilizadas para este fin, los resultados publicados en las últimas dos décadas, deberían ser analizados con prudencia. Se sigue considerando que existen vacíos en el conocimiento respecto a los aspectos ecoepidemiológicos y a la distribución de este patógeno (Pesapane, Foley, Thomas, & Castro, 2019).

Los ejemplares caninos han sido el modelo más estudiado para detectar la frecuencia y/o circulación de género *Ehrlichia*. Los primeros trabajos en Colombia, fueron reportados en el departamento del Meta en el año 2002 en un grupo de ejemplares caninos con sintomatología y presencia de factores asociados, en el cual se demostró la frecuencia inmunodiagnóstica en el 34,6% (9/26) de los perros estudiados (Parrado, Vargas, Hernández, & Vergara, 2003). En el año 2003, se detectaron anticuerpos en un ejemplar canino con sintomatología de CME, en la ciudad de Manizales (Benavides & Ramirez, 2003). En el año 2008, se estudió la circulación del patógeno, gracias al uso de un inmunodiagnóstico, en muestras sanguíneas obtenidas entre los años 2004 y 2005, en ejemplares caninos de la ciudad de Cali, y se determinó la detección de anticuerpos en un 49,5% (50/101) de las muestras estudiadas (Silva-molano, Sánchez-ucrós, & Loaiza-echeverri, 2008). En este mismo año, en ejemplares caninos del departamento de Cundinamarca, por medio de un ensayo de inmunofluorescencia, se estableció la circulación del agente gracias a la presencia de anticuerpos en el 31.8% de los animales muestreados (7/22 ejemplares con títulos superiores a 1:128) (Hidalgo, Vesga, Lizarazo, & Valbuena, 2009). En el año 2012 se realizaron los primeros ensayos moleculares de detección de DNA de *Ehrlichia* spp. en el país. En este estudio, se estableció la detección inmunodiagnóstica, y la amplificación de segmentos del gen 16S rRNA, en

ejemplares caninos de la ciudad de Villavicencio (IFA (1:20) 84% (26/31), PCR anidada (16S rRNA) 45% (14/31)); de Bucaramanga (IFA (1:20) 84% (26/31), PCR anidada (16S rRNA) 45% (14/31)); y de Bogotá (IFA (1:20) 66% (14/21), PCR anidada (16S rRNA) 0% (0/21)) (Vargas-Hernández et al., 2012). También en el año 2012 se estudió en el Valle de Aburrá la presencia de anticuerpos en muestras de laboratorio de caninos en el 45,8% (479/1046) (González & Loaiza, 2012); y la detección molecular de genes conservados de *Ehrlichia* spp. en perros con sintomatología clínica en un 33% (11/33) (Carrillo B et al., 2012). En 2013, en diferentes municipios del departamento del Valle del Cauca, se determinó la detección molecular de fragmentos del gen 16S rRNA en el 54,2% (39/72) de caninos de albergues (Rojas-Triviño et al., 2013). También en el departamento de Córdoba se amplificaron secuencias del gen dsb (disulfido oxidoreductasa, involucrado en la expresión de proteínas que involucran vías de oxidación en el periplasma de bacterias Gram negativas) (Kaakoush, Kovach, & Mendz, 2007) y 16S rRNA, en muestras obtenidas de garrapatas de animales domésticos, encontrando una frecuencia del 3,4% (3/87) para DNA de *Ehrlichia* spp. (Miranda & Mattar, 2015).

En los últimos dos años, las investigaciones que se han publicado, están encaminadas a los diagnósticos moleculares, complementados con algunos inmunodiagnósticos. Los resultados demuestran la detección de material genético del género *Ehrlichia* spp. en diferentes regiones y modelos de estudio en el país. En la región caribe, en el municipio de Aboletes (Departamento de Antioquia) se estableció una frecuencia del 19,4% (7/36) para el género, en perros que habitan en la playa de este municipio (Serna-Vergara, Colorado-Duarte, & Monsalve, 2017); mientras que en Santa Marta, en el año 2017, el 35,6% (26/73) de los perros muestreados amplificaron para el gen dsb (L. R. Castro, Santodomingo, Villamizar, & Foley, 2017). De igual manera, en 2018 en las ciudades de Barranquilla y Cartagena se determinó la circulación de *Ehrlichia* spp, por medio de

inmunodiagnósticos (SNAP 4Dx) en perros con propietarios y de albergues, en el 65% (250/399) de los ejemplares estudiados (Labarthe, Rodriguez, Couto, Mendes-De-Almeida, & Guerrero, 2018). En el año 2019, se determinó la detección del gen 16S rRNA, por PCR en tiempo real, en el 15,3% (26/170) de ejemplares caninos muestreados en las ciudades de Santa Marta y Ciénaga, Magdalena (Pesapane et al., 2019), y en Ovejas, Sucre, se encontró una prevalencia de infección del 16,6% (16/98), gracias al uso de técnicas moleculares (16S rRNA) (Navarro-Dávila, Pérez-Doria, Bejarano Martínez, & Rivero Rodríguez, 2017). En la ciudad de Medellín, y Valle de Aburrá se han realizado varios estudios, en donde se ha podido demostrar la detección inmunodiagnóstica y molecular de Ehrlichia en ejemplares caninos. En un estudio realizado en perros que ingresaron a clínicas veterinarias, se encontró, a través del test SNAP 4Dx, una seroprevalencia del 25,33% (76/300) para el género; por IFI hubo un 32,6% (98/300) ejemplares positivos, y por la técnica de ELISA (TRP19) la detección fue en el 24,66% (74/300) de los animales muestreados (Arrollave et al., 2017). De igual manera en un estudio realizado en un albergue canino del sur del Valle de Aburrá, se determinó una frecuencia molecular (dsb) en el 11% (5/46), e inmunodiagnóstica en el 6,5% (3/46) de los ejemplares estudiados (Posada-Zapata et al., 2017). En el año 2020, fue publicado un estudio, en ejemplares caninos que ingresaron a consultorios veterinarios de la ciudad de Medellín, y se detectó una frecuencia, por medio de la amplificación de segmentos de los genes 16S rRNA, dsb, y TRP36, en el 18% (53/300) de los ejemplares caninos muestreados (Arroyave et al., 2020).

En 2018, en la ciudad de Ibagué, se realizó un estudio de detección molecular de microorganismos de la familia Anaplasmataceae, en el cual se analizaron muestras de animales domésticos y sus garrapatas, dando como resultado una detección de fragmentos de los genes 16S rRNA y dsb del 4.2% (5/119) y 6.7% (8/119) respectivamente (Osorio, Miranda, González, & Mattar, 2018).

Genotipos

Gracias a la diversidad del gen *trp36* de *Ehrlichia canis*, se ha podido identificar hasta la fecha, 4 genotipos (Arroyave et al., 2020):

1. Genotipo Estados Unidos (US), detectado en Norteamérica, Brasil, Nigeria, Camerún, España, Turquía e Israel (Ferreira et al., 2014; Kamani et al., 2013; Zweygarth et al., 2014).
2. Genotipo Brasil (BR), identificado en Brasil y Turquía (Aguiar et al., 2013; Aktas & Özübek, 2019).
3. Genotipo Taiwán (TWN), identificado en Sudáfrica, Tailandia, Turquía y Taiwán (Hsieh, Lee, Tsang, & Chung, 2010; Namboopha, B., Rittipornlertrak, A., Tattiyapong, M., Tangtrongsup, S., Tiwananthagorn, S., Chung, Y. T., & Sthitmatee, 2018).
4. Genotipo Costa Rica (CR), detectado en donantes de sangre humana de Costa Rica (Bouza-Mora et al., 2017), y también descrito en caninos de cuatro asentamientos peruanos (Geiger et al., 2018).

En Colombia, hasta la fecha, existe solo un estudio, realizado en caninos de la ciudad de Medellín, en el cual se demostró la circulación de los genotipos EU, BR y CR (Arroyave et al., 2020).

Fases de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME)

La incubación se da en el transcurso de 8-20 días en donde el microorganismo se multiplica en los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear por fisión binaria, y luego se produce la diseminación en el animal afectado (Figura 2) (Dumler et al., 2001). El curso de la enfermedad tiene tres fases: aguda, subclínica y crónica (McClure et al., 2010).

Fase aguda

La fase aguda tiene una duración promedio de 2 a 4 semanas; presenta signos inespecíficos como fiebre, exudado oculonasal, anorexia, depresión, baja de peso, linfadenomegalia, petequias, equimosis, hepato-esplenomegalia y cambios hematológicos como trombocitopenia secundaria a la inflamación de endotelios vasculares, destrucción inmunológica de plaquetas y secuestro esplénico de las mismas; leve anemia y leucopenia. La mayoría de los perros tienen una recuperación satisfactoria con un adecuado tratamiento, de lo contrario entran a la siguiente fase de infección (McClure et al., 2010).

Fase subclínica

La fase subclínica puede aparecer luego de 60 días post-infección (McClure et al., 2010), y tiene una duración reportada de hasta de 3 años (Villaescusa, García-Sancho, Rodríguez-Franco, Tesouro, & Sainz, 2015). Los pacientes se pueden encontrar aparentemente saludables o con disminución en el peso, al examen de laboratorio el conteo plaquetario se reporta en rangos subnormales con detección de hiperglobulinemia (Trevor Waner, Harrus, & Bogin, 1997). En esta fase los microorganismos, se mantienen en células del sistema fagocítico mononuclear de tejido esplénico, evadiendo la respuesta del sistema inmune. Se desconoce el mecanismo por el cual desencadena la fase crónica en el animal enfermo, pero estudios experimentales indican que, el bazo es el principal órgano de almacenamiento de *Ehrlichia* spp en la fase subclínica; y debido a esto, éste órgano, ha sido considerado importante en la patogenia de la enfermedad (McClure et al., 2010; Villaescusa et al., 2015). El aumento en el tamaño de las plaquetas en esta etapa, sugiere trombopoyesis, y por lo tanto, una médula ósea activa en respuesta a una disminución

patológica en el número de plaquetas circulantes. Esto contrasta con la depresión de la médula ósea que se observa en la fase crónica de la enfermedad (Trevor Waner et al., 1997).

Fase crónica

La fase crónica se caracteriza por la presentación de signos inespecíficos, y atribuibles a desordenes de coagulación, ocasionalmente con lesiones oculares, anormalidades neurológicas, signos músculo esqueléticos, linfadenomegalia, hepato-esplenomegalia y deterioro de la producción medular de elementos sanguíneos (pancitopenia) debido a una afección de la médula ósea. La fase crónica puede observarse luego de 500 días post-infección y ser persistente en el tiempo (McClure et al., 2010). La diátesis hemorrágica es más común en la fase crónica y se manifiesta por petequias y equimosis de mucosas, epistaxis, hematuria, melena y sangrado prolongado en zonas de venopunción debido a alteraciones de la hemostasia primaria. La trombocitopenia severa de la etapa crónica causa hemorragias retinales, hifema y petequias conjuntivales. El paciente puede morir debido a infecciones secundarias, sangrados incontrolables o ambos (Gutierrez, Pérez-Ibarra, & Agrela, 2016; McClure et al., 2010).

Respuesta inmune a la enfermedad

Ehrlichia canis es un microorganismo capacitado para modular la respuesta inmune. El proceso de invasión, dentro de la célula hospedadora, incluye la adhesión, internalización y la proliferación intracelular; seguido por exocitosis y diseminación intercelular (Harrus, 2015). Se ha demostrado la polimerización de actina durante la internalización, en presencia de moléculas de hierro y calcio (Alves et al., 2014). Diferentes proteínas de membrana, incluyendo a las glicoproteínas (gp) 19, gp36 y gp140 (proteínas ricas en serina/treonina, con procesos de o-glucosilación), se encuentran asociadas a la

adhesión e internalización dentro de las células hospedadoras (Mcbride & Walker, 2011). La molécula gp200 contiene numerosas repeticiones de ankirina, lo que media las interacciones proteína – proteína (Harrus, 2015). La translocación de esta proteína en el núcleo de los monocitos, facilita la activación intracelular de vías de señalización de la célula hospedadora, resultando en la generación de defensas antimicrobianas (Nethery et al., 2007). Las inclusiones citoplasmáticas de algunas especies del género, son albergadas dentro de endosomas tempranos, que presentan los marcadores Rab5, antígeno endosómico temprano 1 (EEA1), y el receptor de transferrina (TfR); moléculas indicadores de la evasión lisosómica, y la adquisición de hierro de la célula huésped; estos eventos son considerados esenciales para los procesos de replicación bacteriana (Alves et al., 2014). Otros mecanismos celulares incluyen la participación de la vía de señalización de inositol 3-fosfato (IP3), indicada por un aumento en los niveles de calcio intracelular y de los componentes del citoesqueleto (actina y microtúbulos) (Alves et al., 2014; Mcbride & Walker, 2011; Yasuko Rikihisa, 2010b). En la especie *Ehrlichia canis*, de igual manera, se ha demostrado que la fusión fagosoma-lisosoma, rara vez se observa en las vacuolas, en cultivos celulares (Alves et al., 2014). Estos datos sugieren que, el proceso de propagación del microorganismo (*in-vitro*), depende de la evasión lisosómica; e involucra el citoesqueleto, los componentes de la vía de señalización IP3 / DAG (como la fosfolipasa C, proteína quinasa C y el calcio), y el hierro (Alves et al., 2014).

Mecanismos de evasión inmune bacteriana

Se han documentado múltiples estrategias de evasión, por parte de bacterias del género *Ehrlichia*, contra diferentes mecanismos inmunológicos (Harrus, 2015).

- Inhibición del tráfico bacteriano, y la imposibilidad de formación de los fagolisosomas, a través de la fusión lisosomal.
- Decrecimiento de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

- Inhibición de la apoptosis celular.
- Disminución en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II).
- Disminución en la capacidad inmunológica en la presentación de antígenos.
- Recombinación de genes que expresan proteínas de membrana, resultante en la variación antigénica (Harrus, 2015; Liu, Bao, Lin, Niu, & Rikihisa, 2012; McBride & Walker, 2011).

Anemia hemolítica inmunomediada por el género Ehrlichia

La anemia no regenerativa, está incriminada en la hipoplasia de la médula ósea que conduce a la incapacidad de producción de componentes celulares. Muchos de los síntomas clínicos de CME, como la fiebre, son atribuidas a la sobreproducción de interleucina-1, causado por las células (M. B. De Castro, Machado, De Aquino, Alessi, & Costa, 2004; Parashar, Kumar, & Ashish, 2015). Los mecanismos inmunopatológicos que involucran el incremento de IgG antiplaquetas en suero, es el resultado del reconocimiento anormal por parte de estos anticuerpos y la fagocitosis resultante en las células fagocíticas mononucleares en el hígado y bazo, lo que contribuye aun mas con la trombocitopenia (Harrus, 2015; Parashar et al., 2015; Trevor Waner et al., 2000). La inducción de anemia hemolítica autoinmune, y la presencia de complejos inmunes de anticuerpos antiplaquetarios, sugieren la importancia de los mecanismos inmunes en la patogénesis de la enfermedad (Harrus, 2015; Trevor Waner et al., 2000).

Protocolo de tratamiento contra CME

Las enfermedades transmitidas por bacterias del género *Ehrlichia* spp pueden cursar de forma similar a otras patologías febriles en caninos, el éxito del tratamiento solo se logra mediante un

diagnóstico preciso que permita la aplicación de una terapia adecuada desde estadios iniciales de la enfermedad, por lo que cobra trascendental importancia el establecimiento de un diagnóstico sensible y específico, sumado a un tratamiento que disminuya el tiempo de administración y los efectos indeseables. Actualmente para el tratamiento de la CME se recomienda el manejo con antibióticos de la familia de las tetraciclinas, principalmente la doxiciclina. Sobre este antibiótico han sido publicados múltiples estudios que demuestran su efectividad bacteriostática (Brouqui & Raoult, 1990; Donatien & Lestoquard, 1937; Eddlestone, Diniz, Gaunt, & Hosgood, 2007; Hidrón et al., 2014; Little, 2017; McClure et al., 2010). Anteriormente se utilizaban protocolos con doxiciclina menores a 3 semanas en fase aguda (Plumb, 2011), sin embargo en el año 2002, luego de comprobar la ineffectividad de la terapéutica establecida (Breitschwerdt, Hegarty, & Hancock, 1998; Schaefer et al., 2007) y de surgir un consenso por parte del Grupo de Estudio de Las Enfermedades Infecciosas del American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM), la recomendación reportada fue el uso de la doxiciclina a una dosis de 10 mg/kg por vía oral cada 24 horas durante 28 días (T. Neer et al., 2002). Actualmente no se ha demostrado una evidencia de mecanismos de resistencia bacteriana propios del género *Ehrlichia* spp. a la doxiciclina, y por lo tanto se considera en la actualidad el antibiótico de elección. La mejoría clínica de los pacientes caninos es rápida y generalmente ocurre dentro de las 24 a 48 horas posteriores al inicio del tratamiento en perros con enfermedad de fase aguda o crónica leve. Los conteos de plaquetas aumentan constantemente durante este tiempo y generalmente se restablecen dentro de los parámetros normales después de 14 días (T. Neer et al., 2002).

Doxiciclina como tratamiento de elección

La doxiciclina es un antibiótico bacteriostático miembro de la familia de las tetraciclinas que ha sido utilizado por vías sistémicas en medicina humana y animales domésticos desde hace más de 40 años (Riond et al., 1990). La doxiciclina (y tetraciclinas en general) ingresa a los microorganismos de diferentes formas ya sea por difusión pasiva, a través de canales hidrófilos formados por porinas o por procesos de transporte activo dependientes de energía. En el interior de la célula bacteriana, se unen a la subunidad ribosomal 30s y de esta forma bloquean la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor del complejo ribosomal del mRNA, impidiendo el proceso de transcripción proteica (Del Castillo, 2013; Sumano & Ocampo, 2006; Vicente & Pérez-Tallero, 2010). Debido a su mayor liposolubilidad en comparación con otras tetraciclinas, la doxiciclina posee un mayor volumen de distribución que le permite una mejor penetración a los tejidos a pesar de su unión a las proteínas plasmáticas (Barza, Brown, Shanks, Gamble, & Weinstein, 1975; Riond et al., 1990). La doxiciclina, como las demás tetraciclinas, posee un amplio espectro de acción incluyendo microorganismos del orden Rickettsiales, Mycoplasmas y Chlamidiales (Sumano & Ocampo, 2006). Aunque las tetraciclinas son consideradas seguras, no están exentas de reacciones adversas (Sumano & Ocampo, 2006). Su toxicidad ha sido reportada en diferentes biomodelos (Chiers et al., 2004; Riond et al., 1990; Schölkens, Gerhards, Lindner, 1971). En general, estos efectos están relacionados con sus propiedades irritantes, entre los que se consideran más comunes los efectos gastrolesivos con presencia de vómito (Schulz, Hupfauer, Ammer, Sauter-Louis, & Hartmann, 2011) y diarrea, abscesos asépticos después de aplicación parenteral, y alteración de la microbiota intestinal (Bartlett, Bustetter, Gorbach, & Andrew, 1975), quelación del calcio en sangre, intestinos y huesos en crecimiento; y posibles efectos tóxicos sobre las células hepáticas y renales utilizando altas dosis (Lepper, Zimmerman, Carroll, Caldwell, Spies, Wolfe, 1951).

Además, la doxiciclina está contraindicada en hembras gestantes en diferentes biomodelos animales por ser clasificada como teratogénica (Sumano & Ocampo, 2006). En ejemplares caninos, el vómito se ha considerado la reacción adversa más común durante el tratamiento con doxiciclina, ya que se ha demostrado la presencia de este efecto gastrolesivo en un 18,3% de los perros a los que se les ha tratado con dosis terapéuticas (Schulz et al., 2011).

Perspectivas terapéuticas de los microencapsulados

El empleo de un sistema de transporte de medicamentos con alta especificidad y actividad, en células diana u órganos blanco, sin efectos tóxicos, es considerado un modelo ideal (Saez, 2004). Entre las estrategias biotecnológicas, que hacen parte de estas alternativas de administración controlada de fármacos, se encuentran los sistemas microencapsulados, los cuales cumplen con ciertos criterios considerados deseables (selectividad por el tejido y minimización de efectos indeseables). Los sistemas de liberación controlada transportan fármacos que no pueden ser administrados adecuadamente por vía oral (porque son degradados fácilmente por las enzimas del tracto gastrointestinal, o porque cuentan con propiedades gastrolesivas). Los sistemas microencapsulados tienen como finalidad conseguir una optimización en la liberación del principio activo por medio de mecanismos controlados (Torchilin, 2000), esto se traduce en un mejoramiento de algunos parámetros farmacocinéticos (por ejemplo, un aumento en la biodisponibilidad reportada como AUC). A pesar que el desarrollo de productos microencapsulados farmacéuticos de uso animal es aún incipiente, al compararlo con los producidos para humanos (máxime en los países en vía de desarrollo como Colombia, en donde el diseño y la formulación de medicamentos de uso veterinario es una extensión de los productos usados en terapéutica humana), los sistemas de liberación controlada representan una tecnología

capaz de mejorar la farmacocinética de muchas sustancias, las cuales pueden ser adaptadas para ser usadas por diferentes vías de administración, permitir la reducción del número de dosis necesarias, minimizar los efectos tóxicos, y aumentar y/o mantener concentraciones deseadas (Sáez, 2004).

Contexto nacional en la reglamentación de nuevas formulaciones

Colombia ha venido introduciendo en la normativa nacional, las diferentes disposiciones que se deberían tener, respecto al tema de los medicamentos. Las normas actuales no solo contemplan la reglamentación de los productos en sí mismo, sino también todo lo relacionado con los procesos de fabricación, calidad, seguridad y efectividad, transporte y almacenamiento adecuados, prescripción, accesibilidad, sistemas de control de precios, expendio y despacho, correcta administración y la farmacovigilancia (Huertas, 2012). Sin embargo hoy todavía existen vacíos legales respecto a los procesos de formulaciones de liberación controlada y sus parámetros de bioequivalencia y biodisponibilidad. El Decreto 677/95 es una norma expedida hace 24 años (actualmente vigente), la cual contiene varios aspectos que requieren posiblemente revisión y actualización debido a que las circunstancias del mercado farmacéutico (producto de la globalización) se ha modificado notoriamente desde la expedición del decreto a la fecha. Por otro lado, no existen disposiciones legales explícitas relativas al cumplimiento de buenas prácticas de manufactura (BPM) para productos en fase de investigación (obtención de productos seguros para el consumo humano, que se centralizan en la higiene y la forma de manipulación, en nuevas estrategias innovadoras de formulaciones de liberación controlada). Sin embargo, de acuerdo al Decreto 549 modificado por el Decreto 162 de 2004, los medicamentos deben cumplir con las BPM, y esto aplica para los que sean objeto de investigación. En el país hay disposiciones legales

que establecen las funciones y responsabilidades del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) (en su calidad de autoridad reguladora nacional de medicamentos), esta entidad ejecuta y regula políticas en materia sanitaria. La normativa existente no refleja algunos parámetros y criterios acogidos internacionalmente para productos de liberación controlada, por tanto es necesario definir una regulación clara que se ajuste a la necesidad colombiana, y que a la vez permita garantizar la calidad y eficacia de los mismos (Huertas, 2012).

Conclusiones

Diferentes publicaciones demuestran la necesidad de ahondar en los ensayos clínicos con el fin de lograr moléculas con parámetros farmacocinéticos seguros. En referencia al tratamiento con tetraciclinas para el manejo de *Ehrlichia canis* en el paciente canino, es importante desarrollar más estudios de nuevas formulaciones (productos microencapsulados o nano-estructurados recubiertos con liposomas, biopolímeros, sistemas de liberación controlada de doxiciclina etc.), que brinden una mayor especificidad y efectividad en el tratamiento, y una disminución de efectos indeseables propios de este tipo de antibióticos. Las nuevas estrategias en el área de la tecnología farmacéutica podrían favorecer la liberación controlada del fármaco, el aumento de la vida media, la distribución y la biodisponibilidad necesaria, para producir efectos bacteriostáticos en donde se garantice una acción terapéutica óptima, con efectos secundarios mínimos y la resolución médica del paciente canino.

Referencias

Aguiar, D. M., Zhang, X., Melo, A. L. T., Pacheco, T. A., Meneses, A. M. C., Camargo, L. M. A., ... Labruna, M. B. (2013). Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 164, 315–321.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.015>

Agwuh, K. N., & MacGowan, A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(2), 256–265.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkl224>

Aktas, M., & Özübek, S. (2019). Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Genetic diversity of Ehrlichia canis in dogs from Turkey inferred by TRP36 sequence analysis and phylogeny. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *64*, 20–24.

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.003>

Alfonso, G., Guerrero, M., & Lorenzana-Jiménez, M. (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM*, *52*(6), 260–264.

Alves, R. N., Levenhagen, M. A., Levenhagen, M. M. M. D., Rieck, S. E., Labruna, M. B., & Beletti, M. E. (2014). The spreading process of ehrlichia canis in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. *Veterinary Microbiology*, *168*(2–4), 442–446. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.030>

Armijo, J. (2003). Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. *Farmacología Humana*, 41–79. Retrieved from <http://www.pdcorynthia.sld.cu/Documentos/estudiantes/Absorci%F3n%20distribuci%F3n%20y%20eliminaci%F3n%20de%20los%20f%26armacos.PDF>

Arrollave, E., González, M. S., Fernández-Silva, J. A., Labruna, M., McBride, J. W., & Rodas-González, J. D. (2017). Detección serológica y molecular de agentes rickettsiales potencialmente zoonóticos transmitidos por garrapatas en perros domésticos y sus ectoparásitos de Medellín, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *30*(supl), 307.

Arroyave, E., Rodas-González, J., Zhang, X., Labruna, M., González, M., Fernández-Silva, J., & McBride, J.

- (2020). Ehrlichia canis TRP36 diversity in naturally infected-dogs from an urban area of Colombia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 101367. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101367>
- Bartlett, J. G., Bustetter, L. A., Gorbach, S. L., & Andrew, B. (1975). Comparative Effect of Tetracycline and Doxycycline on the Occurrence of Resistant Escherichia coli in the Fecal Comparative Effect of Tetracycline and Doxycycline on the Occurrence of Resistant Escherichia coli in the Fecal Flora, 7(1), 55–57. <https://doi.org/10.1128/AAC.7.1.55>. Updated
- Barza, M., Brown, R. B., Shanks, C., Gamble, C., & Weinstein, L. (1975). Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8(6), 713–720. <https://doi.org/10.1128/AAC.8.6.713>
- Barza, M., & SchieFe, R. (1977). Antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics. Part 1: Tetracyclines. *AmJ Hosp Pharm*, 34, 49–57.
- Benavides, J. A., & Ramirez, G. F. (2003). Casos clínicos: Ehrlichiosis canina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16(3), 268–274.
- Bocker, R., Muhlberg, W., Platt, D., & Estler, C. (1986). Serum level, half-life and apparent volume of distribution of doxycycline in geriatric patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 30(1), 105–108. <https://doi.org/10.1007/BF00614205>
- Bouza-Mora, L., Dolz, G., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J. J., Salazar-Sánchez, 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>
- Branger, S., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2004). Evaluation of antibiotic susceptibilities of Ehrlichia canis,

- Ehrlichia chaffeensis, and Anaplasma phagocytophilum by real-time PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4822–4828. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4822-4828.2004>
- Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., & Hancock, S. I. (1998). Doxycycline Hyclate Treatment of Experimental Canine Ehrlichiosis Followed by Challenge Inoculation with Two Ehrlichia canis Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), 362–368.
- Brouqui, P., & Raoult, D. (1990). In Vitro Susceptibility of Ehrlichia sennetsu to Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(8), 1593–1596.
- Calic, S. B., Galvão, M. a M., Bacellar, F., Rocha, C. M. B. M., Mafra, C. L., Leite, R. C., & Walker, D. H. (2004). Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 8(3), 259–262. <https://doi.org/S1413-86702004000300011>
- Carou, V., Font, M., & Jover, H. (1999). Nutrición y tratamientos farmacológicos. Interacciones entre alimentos y medicamentos. In M. Rodríguez & A. Sastre-Gallego (Eds.), *Tratado de nutrición* (p. 545). Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos, S. A.
- Carrillo B, L. M., Betancur Cardona, S., Roldán Cardona, D., Pérez Jaramillo, J. E., Galeano Rivera, D., Loaiza Echeverri, E. T., & Giraldo Echeverri, C. A. (2012). Implementation of a PCR-based method for the diagnosis of Ehrlichia spp, in canine in Medellin (Colombia). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.*, 7(2), 38–46.
- Castro, L. R., Santodomingo, A., Villamizar, A., & Foley, J. (2017). Detección molecular de Rickettsia spp y Ehrlichia canis en perros de la ciudad de Santa Marta (Magdalena, Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 30(supl), 307.
- Chambers, H. (2007). Principios generales de la antibioticoterapia. In L. Brunton, J. S. Lazo, & K. Parker

- (Eds.), *Las bases farmacológicas de la terapéutica de la terapéutica* (Undécima e, pp. 1173–1202). McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Chiers, K., Weyens, P., Deprez, P., Heerden, M. van, Meulemans, G., Baert, K., ... Ducatelle, R. (2004). Lingual and pharyngeal paralysis due to acute doxycycline intoxication in veal calves. *Veterinary Record*, *155*(1), 25–26.
- Cicuttin, G., De Salvo, M., Silva, D., Brito, M., & Nava, S. (2017). Ehrlichia canis (Rickettsiales : Anaplasmataceae) en garrapatas Rhipicephalus sanguineus sensu lato del linaje templado (Acari : Ixodidae), provincia de Buenos Aires , Argentina. *Revista FAVE – Sección Ciencias Veterinarias*, *16*, 93–96.
- Cross, R., Ling, C., Day, N. P. J., Mcgready, R., Paris, D. H., Cross, R., ... Daniel, H. (2016). Revisiting doxycycline in pregnancy and early childhood – time to rebuild its reputation? *Expert Opinion on Drug Safety*, *15*(3), 367–382. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1133584>
- Cunha, B., Sibley, C., & Ristuccia, A. (1982). Doxiciclina. *Therapeutic Drug Monitoring*, *4*(2), 115–135.
- Czeizel, A. E., & Rockenbauer, M. (1997). Teratogenic study of doxycycline. *Obstetrics & Gynecology*, *89*(4), 524–528.
- De Castro, M. B., Machado, R. Z., De Aquino, L. P. C. T., Alessi, A. C., & Costa, M. T. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*, *119*(1), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.012>
- Deck, D., & Winston, L. (2012). Tetracyclines, Macrolides, Clindamycin, Chloramphenicol, Streptogramins, & Oxazolidinones. In B. Katzung, S. Masters, & A. Trevor (Eds.), *Basic and clinical Pharmacology (LANGE Basic Science)* (12th editi, pp. 809–820). The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Del Castillo, J. (2013). Tetracyclines. In S. Giguère, J. Prescott, & P. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy*

in veterinary medicine (Fifth Edit, pp. 257–268). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

<https://doi.org/10.1002/9781118675014>

Dolz, G., Ábrego, L., Romero, L., Campos, L., Bouza, L., & Jiménez, A. (2013). Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 55(Supplement 1), 34–40. Retrieved from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022013000400008&nrm=iso

Donatien, A., & Lestoquard, F. (1937). State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. *Arch Inst Pasteur Alger*, 15, 142–187.

Dumler, J. S., Barbet, a. F., Bakker, C. P., Dasch, G. a., Palmer, G. H., Ray, S. C., ... Rurangwira, F. R. (2001). Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia with neorickettsia, description of six new species combinations and designatio. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2001), 2145–2165.
<https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

Eddlestone, S. M., Diniz, P., Gaunt, S., & Hosgood, G. (2007). Doxycycline Clearance of Experimentally Induced Chronic Ehrlichia Canis Infection in Dogs. *J Vet Intern Med*, 21, 1237–1242.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb01944.x>

Ferreira, R., Figueiredo, A., Castro, T., De Oliveira, E., Goncalves, F., Barbosa, A., ... Pereira Almosny, N. (2014). Genetic diversity of Ehrlichia canis strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol*, 23(3), 301–308.

Fourtillan, J., & Saux, M. (1977). Comportement pharmacocinetique des tetracyclines. *Revue Association Pour le Developpement de La Pharmacie Hospitaliere Du Sud-Ouest*, 2, 23–39.

Fourtillan, J., & Saux, M. (1978). Interet des tetracyclines de deuxieme generation. Comportement

pharmacocinetique. *Semaine Des Hopitaux Paris*, (54), 224–230.

Gómez, R., & Más, R. (2007). Reseña analítica de “Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados.” *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*, 38(3), 204–208.

Geiger, J., Morton, B. A., Jose, E., Vasconcelos, R., Tngrian, M., Kachani, M., ... Diniz, P. P. V. P. (2018). Molecular Characterization of Tandem Repeat Protein 36 Gene of Ehrlichia canis Detected in Naturally Infected Dogs from Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(2), 297–302. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0776>

González, H., & Loaiza, J. (2012). Medición de la concordancia en el diagnóstico entre la prueba de Elisa y el cuadro hemático mediante un estudio paraclínico-epidemiológico de la Ehrlichia canis. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 47–51. Retrieved from <http://revistas.ut.edu.co/index.php/ciencianimal/article/viewFile/125/124>

Gutierrez, C. N., Pérez-Ibarra, L., & Agrela, I.-F. (2016). Ehrlichiosis Canina. *Saber*, 28(4), 641–665.

Harrus, S. (2015). Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). *The Veterinary Journal*, 239–240. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.027>

Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. *Veterinary Journal*, 187(3), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>

Hidalgo, M., Vesga, J. F., Lizarazo, D., & Valbuena, G. (2009). A Survey of Antibodies against Rickettsia rickettsii and Ehrlichia chafeensis in Domestic Animals from a Rural Area of Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6), 1029–1030. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.1029>

Hidrón, A., Muñoz, F., & Vega, J. (2014). Asociación Colombiana de Infectología Primer caso de ehrlichiosis monocítica humana reportado en Colombia, 18(4), 162–166.

<https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.001>

Hildebrandt, P., Conroy, J., AE, M., Nyindo, M., & Huxsoll, D. (1973). Ultrastructure of Ehrlichia canis. *Infection and Immunity*, 7(2), 265–271.

Hsieh, Y., Lee, C., Tsang, C., & Chung, Y. (2010). Detection and characterization of four novel genotypes of Ehrlichia canis from dogs. *Veterinary Microbiology*, 146(1–2), 70–75.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.013>

Huertas, V. (2012). *Perfil farmacéutico de la República de Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social y Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS)*.

Kaakoush, N. O., Kovach, Z., & Mendz, G. L. (2007). Potential role of thiol : disulfide oxidoreductases in the pathogenesis of Helicobacter pylori. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 50, 177–183.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00259.x>

Kamani, J., Lee, C., Haruna, A. M., Chung, P., Weka, P. R., & Chung, Y. (2013). Research in Veterinary Science First detection and molecular characterization of Ehrlichia canis from dogs in Nigeria.

Research in Veterinary Science, 94(1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.031>

Keefe, T., Holland, C., Salyer, P., & Ristic, M. (1982). Distribution of Ehrlichia canis among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *J Am Vet Med Assoc*, 236–238.

Kukanich, K., & Kukanich, B. (2015). The effect of sucralfate tablets vs. suspension on oral doxycycline absorption in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38(2), 169–173.

<https://doi.org/10.1111/jvp.12165>

Labarthe, N., Rodriguez, N., Couto, G., Mendes-De-Almeida, F., & Guerrero, J. (2018). A pilot survey of vector-transmitted diseases in Cartagena and Barranquilla, Colombia. *International Journal of*

Applied Research in Veterinary Medicine, 16(1), 63–73.

Labruna, M. B., McBride, J. W., Camargo, L. M. A., Aguiar, D. M., Yabsley, M. J., Davidson, W. R., ...

Walker, D. H. (2007). A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 143(2), 189–195.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.005>

Lazcano-Ponce, E., Salazar-Martinez, E., Angeles-Llerenas, A., Gutiérrez-Castrelló, P., Hernández-

Garduño, A., & Viramontes, J. L. (2004). Randomized clinical trials: Variants, randomisation methods, analysis, ethical issues and regulations. *Salud Publica de Mexico*, 46(6), 559–584.

<https://doi.org/10.1590/S0036-36342004000600012>

Lemos, M. (2002). Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. In L. Botana, M. Landoni, & T.

Martín-Jiménez (Eds.), *Farmacología Veterinaria* (pp. 468–483). Madrid, España: Mc Graw Hill.

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Lepper MH, Zimmerman HJ, Carroll G, Caldwell ER Jr, Spies HW, Wolfe CK, D. H. (1951). Effect of large

doses of aureomycin, terramycin, and chloramphenicol on livers of mice and dogs. *AMA Arch Intern Med.*, 88(3), 284–295.

Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America -*

Small Animal Practice, 40(6), 1121–1140. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.004>

Little, S. E. (2017). Ehrlichiosis. In C. Brisola (Ed.), *Arthropod Borne Diseases* (pp. 205–213). Springer,

Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8>

Liu, H., Bao, W., Lin, M., Niu, H., & Rikihisa, Y. (2012). Ehrlichia type IV secretion effector ECH0825 is

translocated to mitochondria and curbs ROS and apoptosis by upregulating host MnSOD. *Cellular Microbiology*, 14(7), 1037–1050. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01775.x>

- Mavromatis, K., Doyle, C. K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M. P., Chain, P., ... Kyrpides, N. C. (2006). The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *Journal of Bacteriology*, *188*(11), 4015–4023. <https://doi.org/10.1128/JB.01837-05>
- Mcbride, J. W., & Walker, D. H. (2011). Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia* infection : targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *13*(January), 1–19. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001730>
- 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>
- Miranda, J., & Mattar, S. (2015). Molecular detection of *Anaplasma* sp. and *ehrlichia* sp. in ticks collected in domestical animals, Colombia. *Tropical Biomedicine*, *32*(4), 726–735.
- Namboopha, B., Rittipornlertrak, A., Tattiyapong, M., Tangtrongsup, S., Tiwananthagorn, S., Chung, Y. T., & Sthitmatee, N. (2018). Two different genogroups of *Ehrlichia canis* from dogs in Thailand using immunodominant protein genes. *Infection, Genetics and Evolution*, *63*(May), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.027>
- Navarro-Dávila, A. L., Pérez-Doria, A., Bejarano Martínez, E. E., & Rivero Rodríguez, M. E. (2017). Prevalencia de infección con *Ehrlichia* spp en perros asintomáticos de Ovejas, Sucre (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *30*(supl), 324.
- Neer, T., Breitschwerdt, E., Greene, R., & Lappin, M. (2002). ACVIM Consensus Statement. *J Vet Intern Med*, *16*, 309–315.

- Neer, T. M., Breitschwerdt, E. B., Greene, R. T., & Lappin, M. R. (2002). Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med*, *16*(3), 309–315.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0392.x>
- Nelson, M. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1241*(1), 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x>
- Nethery, K. A., Doyle, C. K., Zhang, X., McBride, J. W., Nethery, K. A., Doyle, C. K., ... McBride, J. W. (2007). Ehrlichia canis gp200 contains dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. *Infection and Immunity*, *75*(10), 4900–4908. <https://doi.org/10.1128/IAI.00041-07>
- Osorio, M., Miranda, J., González, M., & Mattar, S. (2018). Anaplasma sp., Ehrlichia sp., and Rickettsia sp. in Ticks: A High Risk for Public Health in Ibagué, Colombia. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *24*(4), 557–562. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.19581>
- Parashar, R., Kumar, A., & Ashish, J. (2015). Evaluation of clinical , biochemical and haematological markers in natural infection of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Parasitic Diseases*, (Jain 1993). <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0688-7>
- Parrado, M., Vargas, F., Hernández, G., & Vergara, H. (2003). Asociación De Los Resultados De Una Prueba Serológica (Elisa) Y Frotis Sanguíneo En Caninos Con Sintomatología Compatible De Ehrlichiosis. *Orinoquia*, *7*(1), 6–11. <https://doi.org/10.22579/20112629.242>
- Perez-Trallero, E., & Iglesias, L. (2003). Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *21*(9), 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1078*,

110–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>

Perez, M., Rikihisa, Y., & Wen, B. (1996). Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: Antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2133–2139.

Pesapane, R., Foley, J., Thomas, R., & Castro, L. R. (2019). Molecular detection and characterization of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from northern Colombia. *Veterinary Microbiology*, 233, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.05.002>

Plumb, D. (2011). Doxycycline. In D. Plumb (Ed.), *Plumb's Veterinary Drug Handbook* (7th Editio, p. 450). St. Paul, Minnesota: PharmaVet Inc.

Posada-Zapata, J., Cabrera J, A., González–Alvarez, D., Rodas G, J., Monsalve B, S., & Londoño B, A. (2017). Identificación de bacterias de la familia Anaplasmataceae en un albergue canino del municipio de Caldas, Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), 6014. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1071>

Rikihisa, Y., Perry, B. D., & Cordes, D. O. (1985). Ultrastructural study of Ehrlichial organisms in the large colons of ponies infected with Potomac horse fever. *Infection and Immunity*, 49(3), 505–512.

Rikihisa, Yasuko. (2010a). Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis: Subversive manipulators of host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 328–339. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2318>

Rikihisa, Yasuko. (2010b). Molecular events involved in cellular invasion by Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum. *Veterinary Parasitology*, 167, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.017>

Rikihisa, Yasuko, Zhi, N., Wormser, G. P., Wen, B., Horowitz, H. W., & Hechemy, K. E. (1997). Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated

- and stably cultivated from a patient in New York State. *Journal of Infectious Diseases*, 175(1), 210–213. <https://doi.org/10.1093/infdis/175.1.210>
- Riond, J. L., Vaden, S. L., & Riviere, J. E. (1990). Comparative Pharmacokinetics of Doxycycline in Cats and Dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13(4), 415–424.
- Rios, R., Franco, S., Mattar, S., Urrea, M., & Tique, V. (2008). Seroprevalencia de *Leptospira* sp., *Rickettsia* sp. y *Ehrlichia* sp. en trabajadores rurales del departamento de Sucre, Colombia. *Revista INFECTIO*, 12, 318–323.
- Ripoll, C. M., Remondegui, C. E., Ordonez, G., Arazamendi, R., Fusaro, H., Hyman, M. J., ... Santos-Buch, C. A. (1999). Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(2), 350–354. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.350>
- Rojas-Triviño, A., Rueda-Hurtado, A., Diaz-Molano, D. M., Meza-Cobo, N. C., Benavides-Montaño, J. A., Imbanchi-López, K., ... Lopez-Bermudez, R. (2013). Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Veterinaria y Zootecnia*, 7(1), 37–48.
- Saivin, S., & Houin, G. (1988). Clinical Pharmacokinetics of Doxycycline and Minocycline. *Clinical Pharmacokinetics*, 15(6), 355–366. <https://doi.org/10.2165/00003088-198815060-00001>
- Saux, M., Mosser, J., Pontagnier, H., & Leng, B. (1983). Pharmacokinetic study of doxycycline polyphosphate after simultaneous ingestion of milk. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 8(1), 43–49.
- Schaefer, J. J., Needham, G. R., Bremer, W. G., Rikihisa, Y., Ewing, S. A., & Stich, R. W. (2007). Tick acquisition of *Ehrlichia canis* from dogs treated with doxycycline hyclate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3394–3396. <https://doi.org/10.1128/AAC.00358-07>

- Schölkens, B. Gerhards, H. Lindner, E. (1971). Circulatory effects of intravenously administered rolitetracycline and other tetracyclines in animal experiments. *Arzneimittel-Forschung*, 24(3), 312–317. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Schulz, B. S., Hupfauer, S., Ammer, H., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2011). Suspected side effects of doxycycline use in dogs - a retrospective study of 386 cases. *The Veterinary Record*, 169(9), 229. <https://doi.org/10.1136/vr.d4344>
- Serna-Vergara, M. C., Colorado-Duarte, L., & Monsalve, S. (2017). Detección de *Anaplasma platys* y *Ehrlichia canis* en ejemplares caninos de dos playas de la región caribe colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 30(supl), 302–303.
- Silva-molano, R. F., Sánchez-ucrós, N., & Loaiza-echeverri, A. M. (2008). Reporte de presentación de *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de caninos en la ciudad de Cali, Colombia. *Veterinaria y Zootecnia*, 2(1), 27–31.
- Smith, K., & Leyden, J. J. (2005). Safety of doxycycline and minocycline: A systematic review. *Clinical Therapeutics*, 27(9), 1329–1342. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.09.005>
- Straughan, D., Fentem, J., & Balls, M. (1997). Replacement alternative and complementary in vitro methods in pharmaceutical research. In *In vitro methods in pharmaceutical research* (pp. 1–13). Academic Press.
- Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). Antimicrobianos. In *FARMACOLOGÍA VETERINARIA* (pp. 236–247).
- Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 11 Suppl 2, S81–S91. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00166-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00166-4)
- Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado,

- R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 254–260.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>
- Vicente, D., & Pérez-Tallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(2), 122–130.
- Villaescusa, A., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., Tesouro, M. Á., & Sainz, Á. (2015). Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with Ehrlichia canis. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 204(3), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.031>
- Von Wittenau, S., Beereboom, J., Blackwood, R., & Stephens, C. (1962). 6-Deoxytetracyclines. III. Stereochemistry at C. 6. *Journal of the American Chemical Society*, 84(13), 2645–2647.
- Waner, T, Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., & Cornelissen, A. (2001). Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis. *Veterinary Parasitology*, 95(1), 1–15.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00407-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00407-6)
- Waner, Trevor, Harrus, S., & Bogin, E. (1997). Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, 69, 307–317.
- Waner, Trevor, Leykin, I., Shinitzky, M., Sharabani, E., Buch, H., Keysary, A., ... Harrus, S. (2000). Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with Ehrlichia canis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77, 145–150.
- Welton, A. (1980). Utilisation des tetracyclines au cours de l'insuffisance renale. *Nouvelle Presse Medicale*, 9, 86–92.

Wilson, R. C., Kemp, D. T., Kitzman, J. V., & Goetsch, D. D. (1988). Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52(1), 12–14.

Zweygarth, E., Cabezas-cruz, A., Josemans, A. I., Oosthuizen, M. C., Matjila, P. T., Lis, K., ... Passos, L. M. F. (2014). In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5, 423–431.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.01.011>

Capítulo II

Análisis farmacocinético de un microencapsulado para la liberación de doxiciclina en el biomodelo canino sano e infectado naturalmente con *Ehrlichia canis*.

Introducción

La doxiciclina es un antibiótico bacteriostático miembro de la familia de las tetraciclinas que se ha utilizado en medicina humana y animales domésticos desde hace más de 40 años (Aronson, 1980; Cunha, Sibley, & Ristuccia, 1982; Riond, Vaden, & Riviere, 1990). Esta molécula posee un mayor volumen de distribución que le permite una mejor penetración en los tejidos, al compararla con otras tetraciclinas (Barza, Brown, Shanks, Gamble, & Weinstein, 1975; Riond et al., 1990; Villaescusa, García-Sancho, Rodríguez-Franco, Tesouro, & Sainz, 2015), y ha sido empleada en el tratamiento de múltiples infecciones caninas, incluyendo las causadas por la bacteria *Ehrlichia canis*, en donde se recomienda un régimen de 10 mg/kg, durante un periodo de 28 días (Neer, Breitschwerdt, Greene, & Lappin, 2002; Villaescusa et al., 2015). La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad que afecta principalmente a perros domésticos y ha sido demostrada su circulación en humanos y fauna silvestre (Bouza-Mora et al., 2017; Perez, Bodor, Zhang, Xiong, & Rikihisa, 2006; Prince, Shah, Martinez, & Moran, 2007; Unver, Perez, Orellana, Huang, & Rikihisa, 2001). Aunque las tetraciclinas son consideradas seguras, no están exentas de efectos indeseados, y han sido reportados indicadores de toxicidad en diferentes biomodelos luego de su uso (Deck & Winston, 2012; Gutierrez, Ocampo, Espinosa, & Sumano, 2014; Schölkens, Gerhards, Lindner, 1971). Se ha determinado que el vómito se puede presentar hasta en el 18,3% de los ejemplares caninos, luego de la administración de doxiciclina en dosis terapéuticas; este signo es considerado como la más frecuente reacción adversa (Villaescusa et al., 2015). En el caso

de infecciones intracelulares tratadas con doxiciclina, el fármaco ingresa con facilidad las membranas celulares, sin embargo, con el fin de garantizar concentraciones en la células blanco (monocitos y macrófagos) (Aguiar et al., 2013; Aktas & Özübek, 2019; Alfonso, Guerrero, & Lorenzana-Jiménez, 2009; Rikihisa, 2010) se generan altos niveles séricos de la molécula; razón por la cual, es común, la presentación de efectos no deseados (Lemos, 2002) durante el mantenimiento de concentraciones consideradas terapéuticas ($MIC > 0,03 \mu\text{g/ml}$) (Chambers, 2007).

Una estrategia que ha sido implementada en las últimas décadas para contrarrestar los efectos adversos de diversas moléculas en la medicina alopática son los sistemas microencapsulados, estos se han convertido en soluciones eficaces y científicamente validadas, dando lugar a su aplicación en productos comerciales (Ahsan, Rivas, Khan, & Torres Suárez, 2002; Fidler & Kleinerman, 1994; Hirota & Terada, 2012). La doxiciclina es un antibiótico especialmente susceptible de incorporarse en un sistema de liberación controlada por su alta lipofilicidad en el tratamiento de diversas infecciones intracelulares (Nelson & Levy, 2011; Villaescusa et al., 2015). En la presente investigación se estudió la farmacocinética de un microencapsulado para la liberación de doxiciclina a nivel preclínico y en el biomodelo canino infectado naturalmente con *Ehrlichia canis*.

Metodología

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Corporación Universitaria Lasallista para Experimentación con Animales (Acta de 8 de junio 06 de 2013), siguiendo las normas estipuladas por el Código de Ética (COMVEZCOL); Capítulo VI de la ley 84 de 1989; Artículo III de la ley 1774 del 2016 y Capítulo VI, título 3, de la ley 576 del 2000 de la República de Colombia. A los

dueños de los albergues caninos se les explicó el tipo de estudio y se obtuvo su consentimiento informado.

Elaboración de microencapsulados

Se prepararon formulaciones mezclando doxiciclina hiclato con un 97,4% de pureza (Arshine Pharmaceutical Co., Ltd, Changsha, Hunan, China) conjuntamente con agentes encapsulantes: sacarosa comercial (Incauca SAS, Colombia), gelatina (Merck, Alemania) y carboximetilcelulosa de sodio 3000 cP (Bell Chem Internacional SA, Colombia) (CMC). Cada componente fue solubilizado independientemente en agua destilada bajo agitación magnética. La solución de doxiciclina y sacarosa fue mezclada y homogeneizada, sobre esta última se adicionó la mezcla de CMC y gelatina. Las suspensiones fueron alimentadas a un equipo de secado por aspersión Mini B-290 (Buchi, Suiza) siguiendo metodologías previamente establecidas por Gallego-Londoño (Figura 3) (Gallego-Londoño, 2017). Las micropartículas obtenidas fueron colectadas en empaques de polietileno autosellable, y posteriormente almacenadas en un cuarto con humedad y temperatura controlada a 45% y 20°C hasta su administración.

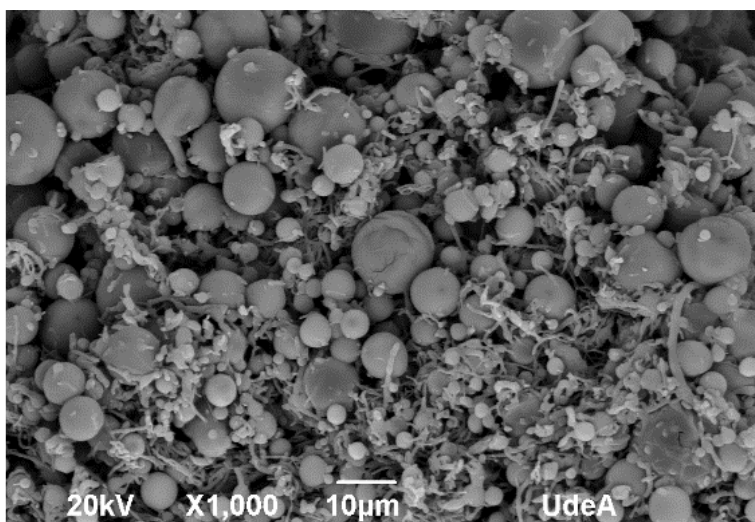


Figura 3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las micropartículas. Doxyciclina recubierta por sacarosa, gelatina y CMC, obtenidas por secado por aspersión. Tomado de Gallego-Londoño (Gallego-Londoño, 2017)

Determinación de la cantidad de doxyciclina en microencapsulado

Para determinar el contenido de doxyciclina en las micropartículas se pesaron 25 mg del producto microencapsulado en un microtubo de 2 µl. Primero se eliminó la doxyciclina libre por la adición de 500 µl de etanol y luego de centrifugar se eliminó el sobrenadante. Posterior al lavado, el precipitado se disolvió con una mezcla de ácido acético – metanol – acetonitrilo. Finalmente, la doxyciclina en la solución fue cuantificada por HPLC-DAD en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC UltiMate 3000® (Dionex, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) acoplado a un detector de arreglo de diodos DAD-3000RS, con los protocolos establecidos por Gallego-Londoño y Mazabel (Gallego-Londoño, 2017; Mazabel-Riera, 2017). Al microencapsulado obtenido por secado a través de aspersión (Spray Drying) le fue medida la eficiencia de encapsulación, la cual fue calculada como la relación entre la masa de doxyciclina en las micropartículas y la masa teórica encapsulada (cantidad inicial adicionada a la suspensión).

Sitios de estudio y toma de muestras

Diez ejemplares caninos, obtenidos de manera aleatoria, del albergue canino “El Hogar de Alicia” localizado en la vereda La Miel, a 2.5 Km del perímetro urbano del municipio de Caldas, Antioquia, fueron muestreados y analizados durante los meses de enero a julio de 2017. El área de estudio se localiza a una altura de 1.750 metros sobre el nivel del mar, tiene una temperatura promedio de $19^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, una humedad de $82\% \pm 5\%$ y una precipitación aproximada de 2.334

mm/año. Luego de la toma de muestras de sangre con el anticoagulante EDTA, estas fueron transportadas y procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico Veterinario hermano “Marco Antonio Serna” f.s.c, de la Corporación Universitaria Lasallista. Las muestras de hematología (para el reclutamiento de los animales) fueron procesadas de manera inmediata. Las muestras de diagnóstico molecular (como criterio de inclusión y exclusión en los estudios) y de cromatografía, fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Perfil farmacocinético de una formulación oral microencapsulada para la liberación de doxiciclina (Formicrodox) en ejemplares caninos sanos (con suministro de alimentos y en ayuno).

Diseño de un ensayo piloto de seguridad cruzado y paralelo, en ejemplares caninos sanos

Se estudió el perfil farmacocinético de una formulación oral microencapsulada para la liberación de doxiciclina (microencapsulado compuesto de sacarosa, gelatina y carboximetilcelulosa) (denominado Formicrodox) comparada con control (Doxiciclina Hiclato Comercial) en el biomodelo canino. Ensayo piloto cruzado y ciego (para el analista de laboratorio) en donde se distribuyeron las intervenciones a 2 ejemplares caninos por medio de asignación aleatoria balanceada.

Criterios de inclusión

Los perros elegibles ingresaron al estudio una vez que el dueño del albergue de origen diera su consentimiento informado. Para que un ejemplar canino fuera elegible, tenía que estar en una edad

estimada entre uno y 12 años, y ser considerado sano de acuerdo con los parámetros de normalidad en el hemograma.

Criterios de exclusión

Infección por *Ehrlichia* spp y *Anaplasma* spp detectada molecularmente por qPCR y PCR utilizando los cebadores EC16S F (5'-TCGCTATTAGATGAGCCTACGT-3') y EC16S R (5'-GAGTCTGGACCGTATCTCAGT-3') (Cabrera, 2018; Peleg, Baneth, Eyal, Inbar, & Harrus, 2010; Waner, Nachum-Biala, & Harrus, 2014), los iniciadores del gen 16S rRNA, 16SANA-F (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACG-3') y 16sANA-R (5'-AGTTTGCCGGGACTTCTTCTGTA-3') (Almazán et al., 2016; Cabrera, 2018; De la Fuente et al., 2006) y los cebadores del gen dsb, dsbF2 (5'-CTTAGTAATACTAGTGGCAAGTTTTCCAC-3') y dsbR2 (5'-GTTGATATATCAGCTGCACCACCG-3') (Cabrera, 2018; Cruz et al., 2012). También se consideraron como criterios de exclusión la infección por hemoprotozoarios caninos (*Babesia* spp, *Hepatozoon* spp) detectados a través de un protocolo de PCR que amplifica un fragmento del gen de la subunidad 18S rRNA, para esto fueron utilizados los iniciadores pla-HS475F (5'-AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA3') y pla-HS1198R (5'-CATAGTCTGAAGTGGAGGAC3') (Cicuttin, Tarragona, De Salvo, Mangold, & Nava, 2015; Inokuma et al., 2002; Posada-Zapata et al., 2017) y los iniciadores PiroA1 (5'-AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC-3') y PiroB (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3') (Cabrera, 2018; Jefferies. R, Ryan. U, Muhl nickel. C, 2003). De igual manera fueron utilizados los primers HEP144-169 (5'-GGT AAT TCT AGA GCT AAT ACA TGA GC-3') y HEP743-718 (5'-ACAATAAAGTAAAAAACAYTTCAAAG-3') (A. Almeida et al., 2012; Cabrera, 2018). A

los animales confirmados molecularmente como negativos se les realizó un hemograma completo y un chequeo en sus historias clínicas para determinar anormalidades físicas o sanguíneas. También se tuvieron en cuenta antecedentes en el último mes de terapia de quimioprofilaxis con tetraciclinas, historia de hipersensibilidad a antibióticos, cambios evidentes y repetidos en las constantes fisiológicas reportados al chequeo médico veterinario (pulso inconstante, anormalidades en los sonidos cardiacos y respiratorios y alteración en la saturación de oxígeno en la sangre), realización simultánea de otros tratamientos con interacción medicamentosa o incompatibles con alguno de los fármacos usados en el estudio (antiácidos, y antibióticos con sinergismo) (Del Castillo, 2013); gestación, ejemplares caninos menores de un año y mayores de 12 años (o estado juvenil o en senectud evidentes), y la no autorización del consentimiento informado por parte del representante legal del albergue canino.

Intervención

Para el estudio cruzado, los ejemplares reclutados fueron transportados a las instalaciones de la Clínica Veterinaria de la Corporación Universitaria Lasallista. Los animales fueron confinados en guacales de metal para hospitalización lo suficientemente amplios para que los perros tuvieran movimiento dentro de los mismos, y contaron con una bandeja metálica inferior para la recolección de sus desechos. Todos los animales recibieron el mismo tipo de alimento y agua a voluntad. El estudio cruzado se realizó luego del suministro de alimentos tomando en cuenta lo publicado por Kukanich y colaboradores (Kukanich & Kukanich, 2014). Para cada experimento el tiempo de administración del fármaco se designó como tratamiento a las 0 horas. Se realizó la primera intervención a los pacientes divididos en dos grupos aleatorizados: a. Control: Doxiciclina Hiclato Comercial (Ronaxan® - Lote: *RXP027IAG*) para perros a una dosis de 10 mg/Kg vía oral después

de la administración de comida; y b. Formicrodox a una dosis de 10 mg/Kg vía oral después de la administración de comida. Las intervenciones fueron suministradas dentro de una porción de alimento balanceado húmedo de aproximadamente 25 gramos. Basado en los resultados obtenidos en estudios preclínicos *in vitro* (Mazabel-Riera, 2017), los tratamientos del microencapsulado fueron administrados dentro de cápsulas de gelatina dura (Globalquimia Ltda., Bogotá-Colombia). Se obtuvieron muestras de sangre obtenidas en las venas cefálica y safena, (3 ml) mediante venopunción en tubos con el anticoagulante EDTA, a las 0, 0.1 (6 minutos), 0.2 (12 minutos), 0.5 (30 minutos), 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, y 120 horas. Se utilizó el condicionamiento operante con premios (aproximadamente 25 gramos de alimento balanceado húmedo) en cada una de las extracciones de sangre. Se realizó un periodo de lavado entre los tratamientos de 15 días (Kukanich & Kukanich, 2014). Luego de este tiempo se cruzaron las intervenciones a las mismas dosis y se tomaron muestras a los mismos tiempos.

Dos meses posteriores al estudio cruzado, se realizó una intervención de vías paralelas, teniendo en cuenta la misma metodología preliminar, pero en condiciones de ayuno de 12 horas antes de cada intervención y sin el suministro de premios. A los ejemplares reclutados para este estudio se les proporcionó alimento luego de 6 horas del tiempo 0.

Detección de doxiciclina en sangre

Se realizó según la metodología usada por Kukanich y colaboradores (Kukanich & Kukanich, 2014), y modificada y adaptada por Mazabel (Mazabel-Riera, 2017). Se tomaron 100 µl de sangre por muestra, a la cual se le adicionó una preparación de 300 µl de acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1% como método de precipitación de proteínas. Esta mezcla fue homogenizada durante 30 segundos. Se centrifugó a 14.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a temperatura

ambiente, y posteriormente, fue extraído el sobrenadante que se llevó a viales ámbar de cromatografía de 2 ml, usando filtros de nylon de 0,22 μm con acople a jeringa (acrodiscos). Este proceso se repitió 3 veces hasta completar los 900 μl de acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1% para su análisis cromatográfico, con el fin de detectar concentraciones del analito. El análisis de la doxiciclina se realizó por medio de UPLC-MS/MS. El equipo de cromatografía usado fue un Xevo TQD (Waters Corporation ®) con un detector TQD. Para este proceso se realizó una curva usando 9 puntos de calibración (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$), a los cuales se les calculó el R^2 (coeficiente de determinación) con la ecuación: $y = mx + b$, donde: $y = \text{AUC}$, $m =$ intercepto, $x =$ concentración y $b =$ pendiente.

Evaluación de parámetros farmacocinéticos

Se evaluaron múltiples variables farmacocinéticas. Los parámetros analizados fueron área bajo la curva (AUC), concentración máxima en plasma (C_{max}), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), y tiempo máximo en alcanzar la concentración máxima (T_{max}) y el parámetro $\text{AUC}_{0-24}:\text{MIC}$, por medio del software PK Solutions 2.0™ y el complemento del programa Excel PK Solver.

Perfil farmacocinético de una formulación oral microencapsulada para la liberación de doxiciclina (Formicrodox) en el tratamiento de la CME.

Diseño de un ensayo preclínico de seguridad, en pacientes caninos con CME

Se estudió el perfil farmacocinético de una formulación oral microencapsulada para la liberación de doxiciclina (compuesto de sacarosa, gelatina y carboximetilcelulosa) (denominado Formicrodox) comparada con control (Doxiciclina Hiclato Comercial), en el tratamiento de CME

durante 28 días, en perros procedentes de albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia - Colombia. Ensayo preclínico explicativo de grupos paralelos de equivalencia, unicéntrico, triple ciego y con asignación aleatoria por bloques balanceados.

Criterios de inclusión

Los perros elegibles solo ingresaron al estudio una vez que el dueño del albergue de origen diera su consentimiento informado. Para que un ejemplar canino fuera elegible, tenía que estar en una edad comprendida entre uno y 12 años, con infección por *Ehrlichia canis* confirmada por detección molecular por qPCR y PCR con los mismos protocolos utilizados para los estudios en ejemplares caninos considerados sanos (Almazán et al., 2016; Cruz et al., 2012; Peleg et al., 2010).

Criterios de exclusión

Como criterios de exclusión se tuvo en cuenta la coinfección por hemoprotozoarios caninos (*Babesia* spp, *Hepatozoon* spp) (A. P. Almeida et al., 2012; Jefferies. R, Ryan. U, Muhlnickel. C, 2003) y por *Anaplasma platys* confirmada por detección molecular (Almazán et al., 2016; Peleg et al., 2010) con los mismos protocolos utilizados para los estudios en ejemplares caninos considerados sanos. A los animales confirmados molecularmente positivos a *Ehrlichia canis* se les realizó un chequeo en sus historias clínicas con los mismos criterios de exclusión tenidos en cuenta en el ensayo piloto, excepto los cambios en los parámetros hematológicos.

Reclutamiento de los ejemplares caninos

198 ejemplares caninos provenientes de los albergues “El Hogar de Alicia” localizado en la vereda La Miel y el “Albergue Municipal de Caldas” en la vereda La Salada, a 2.5 y 7 Km respectivamente

del perímetro urbano del municipio de Caldas, Antioquia, fueron muestreados y analizados durante los meses de julio de 2017 a febrero de 2018. Las muestras de sangre, tanto para hemogramas como para el diagnóstico molecular, fueron tomadas con jeringas estériles de 3 ml y agujas de calibre 21, y depositadas en tubos con EDTA y sin anticoagulante. Las muestras fueron transportadas y procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico Veterinario hermano “Marco Antonio Serna” f.s.c de la Corporación Universitaria Lasallista.

Aleatorización

Después de haber escogido a los pacientes, la aleatorización se produjo a través de un esquema computarizado. Se generó una secuencia de asignación al azar usando números aleatorios creados por computadora para los grupos Formicrodox y Doxiciclina Hiclato Comercial como control. Se utilizó asignación aleatoria por bloques balanceados y razón de asignación 1:1, para garantizar el mismo tamaño de los grupos usando el software SPSS versión 22. Se ocultó la secuencia de asignación en sobres opacos y sellados. Estos sobres fueron guardados en el laboratorio de diagnóstico clínico veterinario de la Corporación Universitaria Lasallista y sólo tuvo acceso a ellos un médico veterinario, quien fue asignado responsable del suministro de los tratamientos.

Intervención

Los ejemplares escogidos para el estudio fueron transportados a las instalaciones de la Clínica Veterinaria de la Corporación Universitaria Lasallista y 15 días antes de la intervención fueron desparasitados con Fluralaner, Febantel, Praziquantel y Pamoato de Pirantel. Los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones de los estudios piloto (cruzado y paralelo), confinados en guacales de metal de hospitalización lo suficientemente amplios para que tuvieran movimiento

dentro de los mismos, y contaron con una bandeja metálica inferior para la recolección de sus desechos. Todos los animales recibieron el mismo tipo de alimento y agua a voluntad. Se utilizó el condicionamiento operante con premios en cada uno de los muestreos (aproximadamente 15 gramos de alimento balanceado húmedo). La intervención tuvo una duración de 28 días, y para cada experimento el tiempo 0 de administración del fármaco se designó como tratamiento a las 0 horas. Se asignaron los tratamientos en dos grupos paralelos así: el primer tratamiento a los pacientes aleatorizados con Doxiciclina Hiclato Comercial, y en el segundo se utilizó la formulación oral microencapsulada de doxiciclina (Formicrodox) a una dosis de 10 mg/Kg por vía oral cada 24 horas por 28 días (dosis establecida en estudios preliminares) (Mazabel-Riera, 2017). Durante el estudio se obtuvieron muestras de sangre (3 ml) mediante venopunción a las 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 240, 360, 480 y 672 horas. Un médico veterinario fue asignado como encargado de la administración de los tratamientos y no tomó parte en el análisis de los resultados. La medicación se administró por 28 días (10 de marzo - 7 de abril de 2018) en los dos grupos estudiados. Los tratamientos a los perros les fueron suministrados en ayunas, y 2 horas posteriores a la ingesta de los fármacos se les ofreció alimento; sin embargo, las intervenciones fueron administradas conjuntamente con premios (aproximadamente 25 gramos de alimento balanceado húmedo). Los animales permanecieron en la clínica veterinaria de la Corporación Universitaria Lasallista durante la totalidad del estudio, y recibieron observación constante por parte del personal veterinario de la institución. Los perros recibieron paseos de 20 minutos en promedio 3 veces al día, momento en el que fueron evaluados comportamientos o indicadores físicos que pudiesen estar correlacionados con efectos adversos reportados durante el tratamiento con doxiciclina. La detección del antibiótico en sangre se realizó según la metodología usada por Kukanich y colaboradores (Kukanich & Kukanich, 2014), y modificada por Mazabel (Mazabel-

Riera, 2017). La metodología utilizada para el análisis farmacocinético fue la misma que se empleó en los estudios piloto (cruzado y paralelo) con los ejemplares caninos sanos.

Análisis estadístico

Para el análisis de las características basales se utilizó como test de normalidad el método de Shapiro-Wilk. Los datos hematológicos cumplieron con una distribución normal, y se utilizó la prueba T para muestras relacionadas. Las concentraciones séricas de doxiciclina se informaron como la media \pm SD (desviación estándar) y los parámetros farmacocinéticos se calcularon para cada perro. Para el análisis de estas concentraciones a diferentes tiempos se realizó un estudio de tipo longitudinal con más de dos medidas, y debido a que los resultados de cromatografía no pasaron el test de homogeneidad de varianza se utilizó el análisis bidimensional de Friedman de varianza por rangos para muestras relacionadas. Un valor de p menor o igual a 0,05 fue considerado significativo. Los resultados fueron analizados con los programas Excel Office 2013 SigmaPlot 12.0, GraphPad Prisma versión 7 y SPSS versión 22.

Resultados

Elaboración del microencapsulado

Para el ensayo preclínico de grupos paralelos en el biomodelo canino infectado naturalmente con *Ehrlichia canis*, se realizaron cuatro montajes del sistema microencapsulado por medio de secado por aspersión. La cantidad de doxiciclina por cada 100 gramos de microencapsulado obtenido en promedio fue de $9,902 \pm 2,236$ gramos, basado en este resultado se usó un volumen total de microencapsulado al día por ejemplar canino (hasta llegar a una dosis de 10 mg/Kg) de $2,087 \pm 0,390$ gramos en promedio, por vía oral durante 28 días de tratamiento. El límite de detección de

doxiciclina sérica en el equipo se pudo determinar para valores de concentración por encima de 0,03 ppm ($\mu\text{g/ml}$) con un nivel de confianza del 95%.

Ensayo piloto de seguridad

Reclutamiento y análisis hematológico

De 132 ejemplares del albergue canino “Hogar de Alicia”, fueron escogidos a conveniencia 10 perros a los cuales se les realizó hemograma, química sanguínea, qPCR y PCR para la detección de fragmentos del gen 16S rRNA para la detección de microorganismos de la familia Anaplasmataceae; y para la detección de fragmentos del gen 18S rRNA por PCR que amplifica para hemoprotozoarios caninos (*Babesia* spp y *Hepatozoon* spp). Cinco ejemplares cumplieron con los criterios de inclusión y no tuvieron criterios de exclusión, de este grupo fueron reclutados dos individuos a conveniencia por el diseño escogido para el estudio y por condiciones de manejo en el momento del trabajo de campo (docilidad y similitud en la condición corporal) (Tabla 1).

Tabla 1

Ensayo piloto: Características basales y posteriores a las intervenciones en caninos sanos. n=2 (100%).

CARACTERÍSTICAS BASALES Y POSTERIORES A LAS INTERVENCIONES N=2	
(%)	
Raza	Mestizos 2 (100)
Sexo	1 hembra (50), 1 macho (50)
Peso promedio	24 \pm 4,24 Kg
<i>Ehrlichia</i> spp, <i>Anaplasma</i> spp (qPCR), <i>Ehrlichia</i> spp, <i>Anaplasma</i> spp, <i>Hepatozoon</i> spp, <i>Babesia</i> spp (PCR)	Negativos 2 (100)

Anormalidades (Frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, fiebre) al chequeo médico, eventos vómito, diarrea, antecedentes de tratamientos con tetraciclinas						Ausentes (100)
Parámetro hematológico	Datos de referencia para la especie	Promedios en los individuos reclutados antes del estudio	Normalidad	Promedios en los individuos reclutados después del estudio	Normalidad	Diferencia antes y después de los tratamientos
Eritrocitos (mill/ μ l)	5,40 - 8,50	7,94 \pm 1,023	0.952	7,46 \pm 0,238	0.875	0.502
Hemoglobina (g/dl)	43800	19,075 \pm 2,676	0.909	17,125 \pm 0,865	0.544	0.326
Hematocrito (%)	37 - 56	55,5 \pm 7,304	0.952	51,175 \pm 0,942	0.479	0.358
VCM (Fl)	65 - 77	70 \pm 0,816	0.683	68,75 \pm 1,258	0.406	0.080
HCM (Pg)	21 - 26,2	24 \pm 0,294	0.348	22,925 \pm 0,830	0.365	0.105
CHbCM (g/dl)	32 - 37	34,325 \pm 0,512	0.426	33,375 \pm 1,158	0.145	0.278
ADE (%)	43435	15,35 \pm 0,714	0.842	14,9 \pm 0,163	0.683	0.281
Plaquetas (x 10 ³ / μ l)	200 - 500	298,75 \pm 82,382	0.269	343 \pm 188,377	0.604	0.548
Proteínas plasmáticas (g/l)	50 - 80	66,5 \pm 3	0.224	62,5 \pm 1,914	0.272	0.066
Leucocitos totales (μ l)	5000 - 14100	13945 \pm 1790,539	0.305	7817,5 \pm 7840,895	0.066	0.257
Eosinófilos (μ l)	100 - 1900	1084 \pm 369,768	0.389	1352,5 \pm 467,867	0.834	0.555
Neutrófilos (μ l)	3300 - 10000	9071,25 \pm 1567,840	0.090	9110,5 \pm 1266,596	0.883	0.973
Linfocitos (μ l)	500 - 4500	3023,25 \pm 373,979	0.965	2527,25 \pm 767,857	0.050	0.156
Monocitos (μ l)	100 - 1300	766,5 \pm 346,083	0.417	859,5 \pm 412,023	0.490	0.760
ALT (U/l)	21 - 102	35,25 \pm 8,057	0.508	38,75 \pm 0,132	0.129	0.077
Creatinina (mg/dl)	0,5 - 1,5	1,17 \pm 0,132	0.900	1,1175 \pm 0,056	0.155	0.396

*Datos de referencia para la especie (Schultze, 2000; Latimer, Prasse, & Mahaffey, 2005; Mackin, & Littlewood, 2000).

Evaluación de los parámetros farmacocinéticos: Estudio piloto cruzado con dos periodos de tiempo sin ayuno

La concentración plasmática de doxiciclina después de la administración de una dosis de 10 mg/Kg fue determinada (Tabla 2). Los parámetros farmacocinéticos fueron analizados por medio de análisis no compartimental.

Tabla 2

Parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis no compartimental en dos ejemplares caninos. Estudio cruzado con dos periodos de tiempos a una dosis de 10 mg/Kg de doxiciclina.

Parámetro	Unidad	Formicrodox	Control
Lambda_z	1/h	0,116 ± 0,094	0,081 ± 0,001
t1/2	h	8,954 ± 7,302	8,465 ± 0,192
Tmax	h	6,5 ± 7,778	6 ± 2,828
Cmax	µg/ml	0,417 ± 0,067	0,518 ± 0,274
AUC 0-t	µg/ml*h	8,112 ± 5,260	10,428 ± 9,001
AUC 0-inf_obs	µg/ml*h	8,249 ± 5,094	10,689 ± 9,218
AUMC 0-inf_obs	µg/ml*h ²	126,692 ± 84,429	171,596 ± 172,645

Luego de la administración oral de las intervenciones se obtuvieron concentraciones de doxiciclina por encima del nivel de detección después de 12 a 30 minutos en los dos ejemplares caninos, y durante las 36 horas posteriores a la intervención. No fueron detectadas concentraciones de doxiciclina del tratamiento y el control en ninguno de los ejemplares caninos luego de 48 horas (Figura 4).

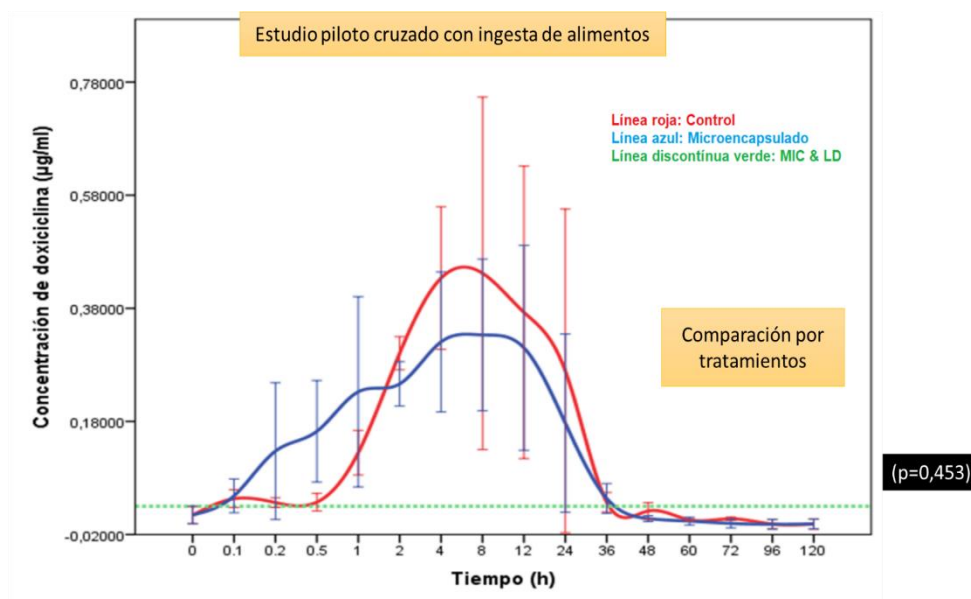


Figura 4. Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$). Formicrodox (azul) Vs Control (rojo) en dos ejemplares caninos durante 120 horas sin ayuno. *Estudio cruzado con dos periodos de tiempo y un periodo de lavado de 20 días, a una dosis de 10 mg/Kg oral de doxiciclina. MIC y LD: 0.03 $\mu\text{g/ml}$ (verde).*

Para el producto microencapsulado, el promedio del tiempo de vida media fue de $8,954 \pm 7,302$ horas, mientras que la media del tiempo máximo fue de $6,5 \pm 7,778$ horas. Respecto al control, el promedio de tiempo de vida media fue de $8,465 \pm 0,192$ horas, mientras que el promedio del tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima del fármaco en la sangre fue de $6 \pm 2,828$ horas. Por ser un estudio cruzado, la variabilidad de los datos obtenidos en la determinación de doxiciclina sérica de los individuos usados como intervención y control fue menor cuando se compararon los parámetros de detección en promedio de manera individual que al hacerlo entre los dos ejemplares estudiados (Tabla 3).

Tabla 3

Promedios de la desviación estándar de detección de doxiciclina sérica (UPLC-MS/MS), en los ejemplares de manera individual y por tratamientos instaurados. Estudio cruzado con dos periodos de tiempo y un periodo de lavado de 20 días, 10 mg/Kg oral de doxiciclina.

	Ejemplar 1		Ejemplar 2		Promedio intervenciones	
	Control	Formicrodox	Control	Formicrodox	Control	Formicrodox
SD	0,0053	0,0026	0,0026	0,0117	0,0617	0,0703

La diferencia entre los tratamientos no fue estadísticamente significativa ($p=0,453$). De igual manera no existió diferencia estadísticamente significativa en los tratamientos cuando se compararon entre cada paciente intervenido (Ejemplar canino 1 $p=0,157$, ejemplar canino 2 $p=0,724$) (Figura 5).

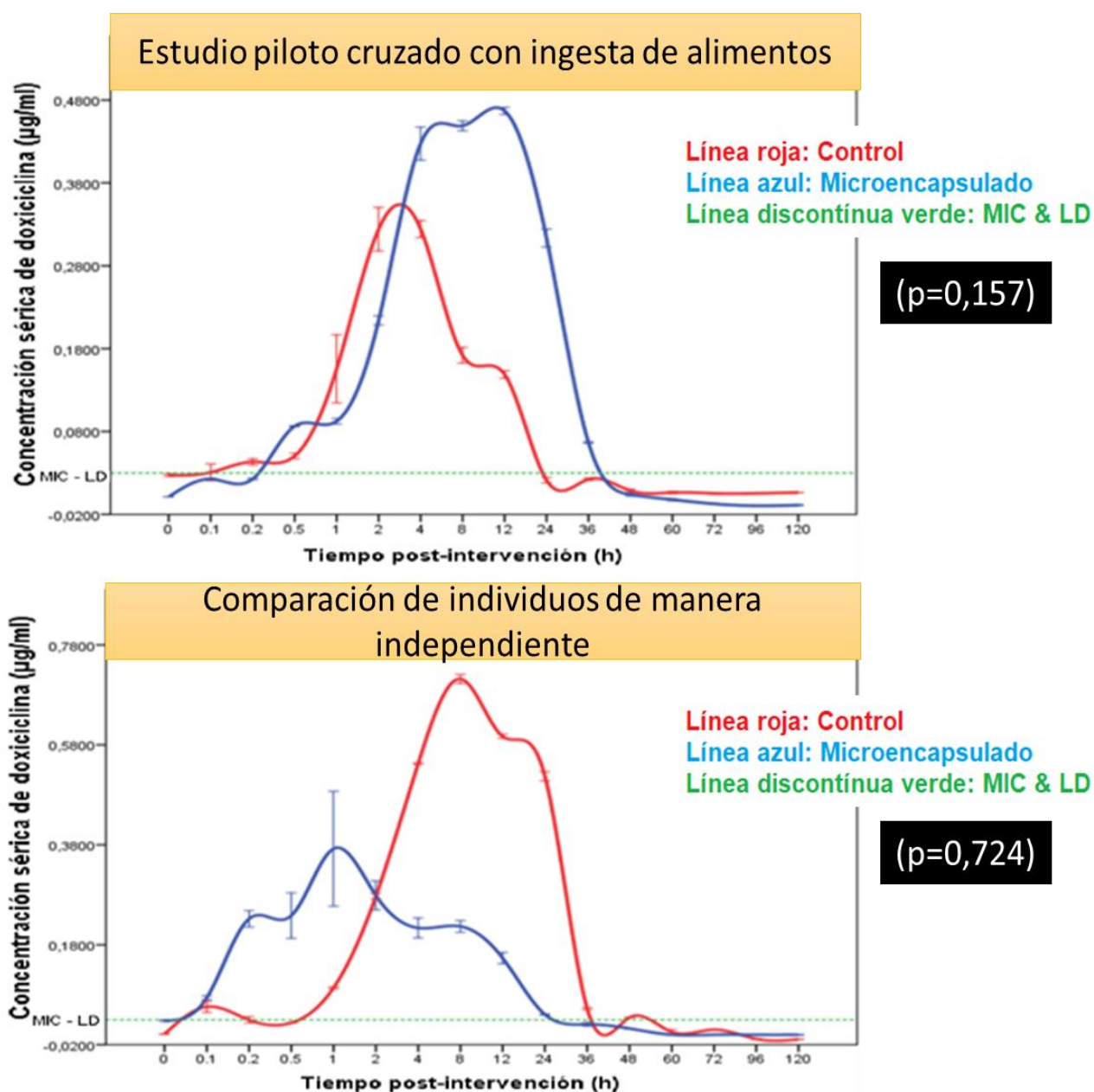


Figura 5. Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$) Formicrodox (azul) Vs Control (rojo) en dos ejemplares caninos (ejemplar 1 figura superior, y 2 figura inferior) durante 120

horas, de manera independiente sin ayuno. Panel derecho escala en tiempo real Formicrodox (azul) Vs Control (rojo). Estudio cruzado con dos periodos de tiempo y un periodo de lavado de 20 días, a una dosis de 10 mg/Kg oral de doxiciclina. MIC y LD: 0.03 µg/ml (línea discontinua verde).

Evaluación de los parámetros farmacocinéticos: Estudio piloto paralelo en un periodo de tiempo en condiciones de ayuno

Debido a que la concentración máxima alcanzada para la intervención microencapsulada y control ($0,417 \pm 0,067$ y $0,518 \pm 0,274$ µg/ml respectivamente), luego del tratamiento a la par con la ingesta de alimentos, se consideró inferior a lo reportado en otros estudios ($>2,4$ µg/ml) (Arciniegas Ruiz et al., 2015; Michel, Mosser, & Fauran, 1979); se realizó un estudio piloto posterior de tipo paralelo con los mismos perros en condiciones de ayuno (Tabla 4).

Tabla 4

Parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis no compartimental en dos ejemplares caninos. Estudio paralelo en un periodo de tiempos a una dosis de 10 mg/Kg de doxiciclina.

Parámetro	Unidad	Formicrodox	Control
Lambda_z	l/h	0,101	0,080
t1/2	h	6,832	8,581
Tmax	h	1	1
Cmax	µg/ml	1,233	1,081
AUC 0-t	µg/ml*h	7,947	7,925
AUC 0-inf_obs	µg/ml*h	7,955	8,024
AUMC 0-inf_obs	µg/ml*h ²	66,285	79,681

Para este estudio no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p=0.262$). Para el microencapsulado el promedio del tiempo de vida media fue de 6,832 horas y

para el control de 8,581 horas. El tiempo máximo para los dos tratamientos se obtuvo a la primera hora de administración de la doxiciclina. La concentración máxima alcanzada para los dos tratamientos superó el valor de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (Formicrodox: 1,233 $\mu\text{g/ml}$; Control: 1,081 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 6).

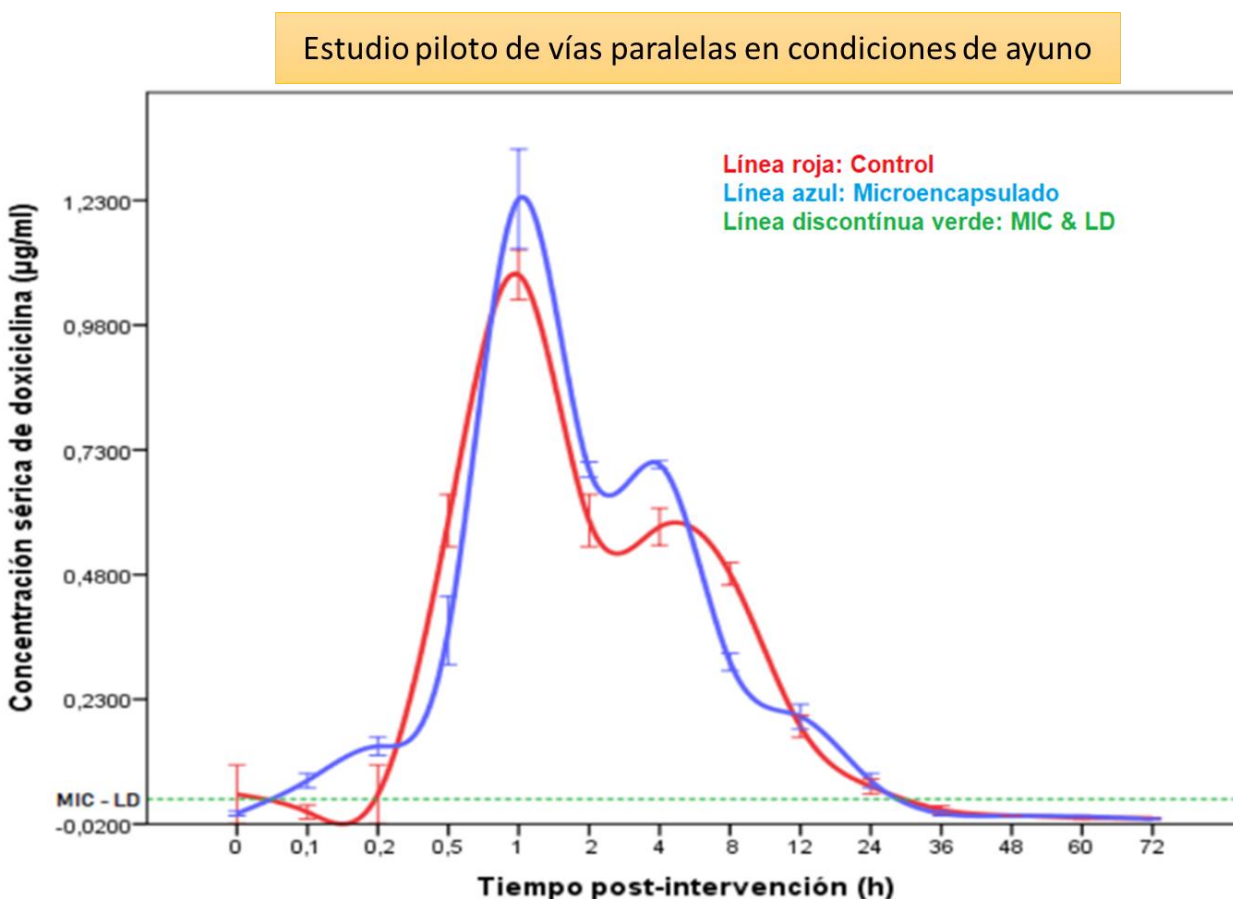


Figura 6. Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$) Formicrodox (azul) Vs Control (rojo) en dos ejemplares caninos durante 120 horas en condiciones de ayuno. Panel derecho escala en tiempo real Formicrodox (azul) Vs Control (rojo). *Estudio piloto paralelo, a una dosis de 10 mg/Kg oral de doxiciclina. MIC y LD: 0.03 $\mu\text{g/ml}$ (Línea discontinua verde).*

Ensayo preclínico de seguridad

Reclutamiento

Fueron muestreados 132 ejemplares caninos del albergue canino “Hogar de Alicia”, y 66 ejemplares del “Albergue Municipal Canino del municipio de Caldas”, a estos animales se les realizó qPCR y PCR para la detección de fragmentos del gen 16S rRNA para microorganismos de la familia Anaplasmataceae; y para la detección de fragmentos del gen 18S rRNA por PCR que amplifica para hemoprotozoarios caninos (*Babesia* spp y *Hepatozoon* spp). Cinco ejemplares cumplieron con los criterios de inclusión y no tuvieron criterios de exclusión, de este grupo fueron reclutados cuatro individuos de manera aleatoria (aleatorización por bloques balanceados) por el diseño escogido para el estudio (Tabla 5).

Tabla 5

Ensayo preclínico: Características basales de los ejemplares caninos con CME reclutados para el estudio.

CARACTERÍSTICAS BASALES N=4 (%)	
Raza	Mestizos 4 (100)
Sexo	3 hembras (75), 1 macho (25)
Peso promedio	21 ± 3,560 Kg
<i>Ehrlichia canis</i> (qPCR y PCR)	Negativos 2 (100)
Anaplasma spp (qPCR), Anaplasma spp, Hepatozoon spp, Babesia spp (PCR)	Negativos 4 (100)

Perfiles cinéticos de una formulación oral microencapsulada en el biomodelo canino infectados naturalmente con Ehrlichia canis.

Se obtuvieron 18 muestras por ejemplar canino (y analizadas por triplicado). Fueron comparadas las concentraciones de doxiciclina (Formicrodox Vs Control) en el manejo de la CME después de múltiples administraciones orales a dosis terapéuticas (10 mg/Kg) (Figura 7) (Tabla 6).

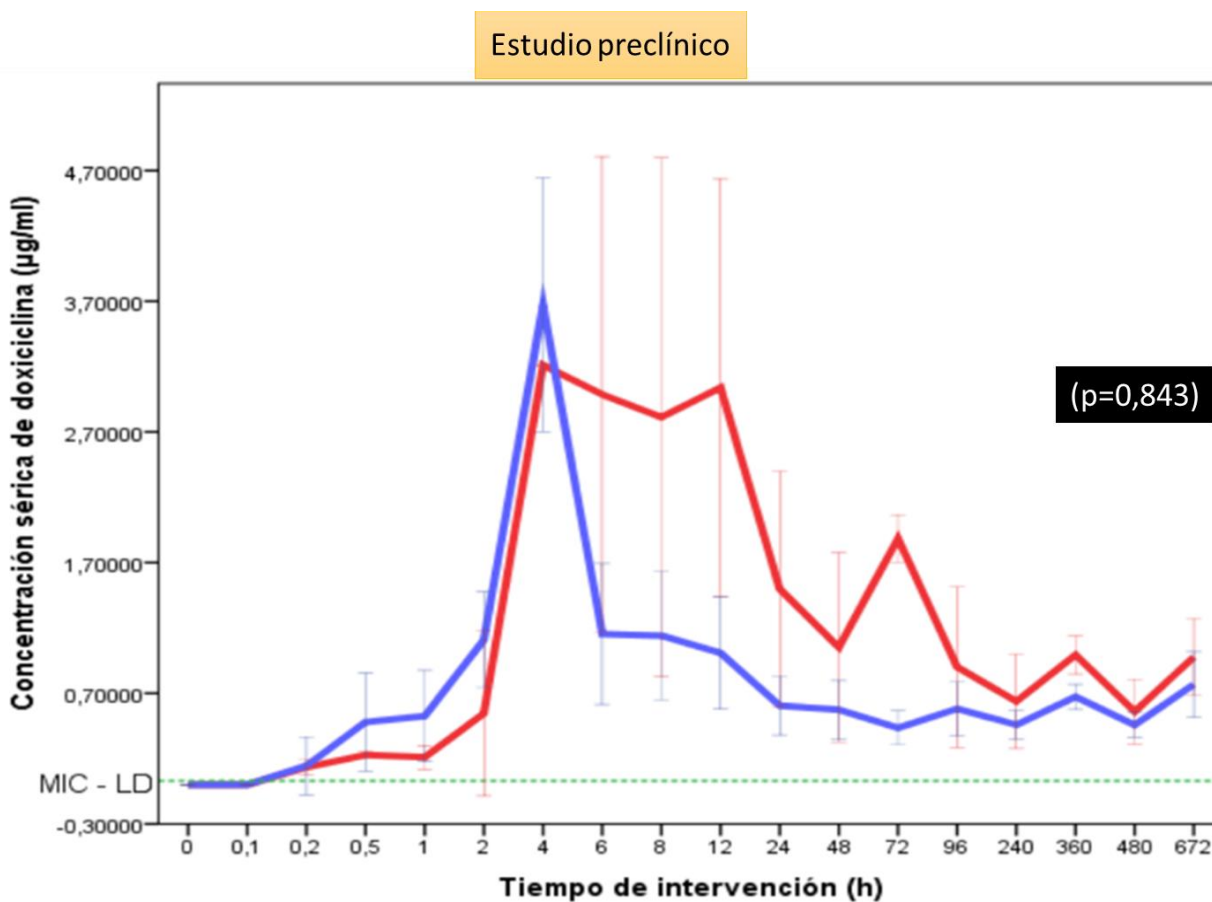


Figura 7. Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$) Formicrodox (azul) Vs Control (rojo) en ejemplares caninos durante 28 días en el manejo de la CME. Panel derecho escala en tiempo real Formicrodox (azul) Vs Control (rojo). Estudio paralelo de múltiples administraciones orales a dosis terapéuticas de 10 mg/Kg oral de doxiciclina. MIC y LD: 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (Línea discontinua verde).

Para este estudio no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p= 0,843$).

Tabla 6

Media \pm SD de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g/ml}$) Formicrodox (azul) Vs Control (rojo) en ejemplares caninos con CME; y diferencias entre la concentración de doxiciclina para los tratamientos.

Tiempo (h)	Hora	n	Media	Normalidad	Diferencia entre
			Concentración de doxiciclina		tratamientos a la hora del muestreo
0	Control	6	,000 \pm 0	-	-
	Formicrodox	6	,000 \pm 0		
0,1	Control	6	,000 \pm 0	-	-
	Formicrodox	6	,000 \pm 0		
0,2	Control	6	,000 \pm 0	-	-
	Formicrodox	6	,000 \pm 0		
0,5	Control	3	0,228 \pm 0,027	0,951	0,234
	Formicrodox	5	0,259 \pm 0,116		
1	Control	6	0,210 \pm 0,086	0,745	0,041*
	Formicrodox	6	0,525 \pm 0,333		
2	Control	5	0,545 \pm 0,508	0,224	0,064
	Formicrodox	5	1,101 \pm 0,294		
4	Control	3	3,211 \pm 1,028	0,515	0,214
	Formicrodox	3	3,555 \pm 0,391		
6	Control	3	2,986 \pm 1,581	0,144	0,430

	Formicrodox	6	1,153 ± 0,514		
8	Control	6	2,812 ± 1,891	0,911	0,132
	Formicrodox	6	1,141 ± 0,467		
12	Control	5	2,849 ± 1,622	0,770	0,052
	Formicrodox	6	1,011 ± 0,455		
24	Control	6	1,498 ± 0,859	0,995	0,065
	Formicrodox	6	0,605 ± 0,214		
48	Control	6	1,051 ± 0,689	0,566	0,394
	Formicrodox	6	0,573 ± 0,213		
72	Control	3	1,884 ± 0,194	0,525	0,000*
	Formicrodox	6	0,434 ± 0,124		
96	Control	6	0,900 ± 0,584	0,259	0,937
	Formicrodox	6	0,581 ± 0,195		
240	Control	6	0,638 ± 0,342	0,586	0,699
	Formicrodox	6	0,458 ± 0,102		
360	Control	3	0,993 ± 0,155	0,998	0,005*
	Formicrodox	6	0,607 ± 0,030		
480	Control	6	0,560 ± 0,236	0,460	0,699
	Formicrodox	6	0,457 ± 0,090		
672	Control	5	0,957 ± 0,307	0,713	0,278
	Formicrodox	6	0,744 ± 0,259		

La concentración plasmática de doxiciclina después de la administración de una dosis de 10 mg/Kg al día por vía oral durante 28 días antes del consumo de alimentos fue determinada. Los parámetros farmacocinéticos fueron analizados por medio de análisis no compartimentales (Tabla 7) y bicompartimentales (Tabla 8).

Tabla 7

Parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis no compartimental en ejemplares caninos con CME. Estudio paralelo (Formicrodox Vs Control) por 28 días a una dosis de 10 mg/Kg de doxiciclina al día.

Parámetro	Unidad	Formicrodox	Control
Lambda_z	1/h	0,00098 ± 0,00062	0,00193 ± 0,00068
t1/2	h	701,805 ± 1378,061	359,226 ± 281,771
Tmax	h	4 ± 0	4 ± 0
Cmax	µg/ml	3,555 ± 1,678	3,211 ± 4,053
AUC 0-t	µg/ml*h	382,975 ± 23,230	600,3236 ± 360,020
AUC 0-inf_obs	µg/ml*h	1136,269 ± 1122,551	1096,292 ± 290,993
AUMC 0-inf_obs	µg/ml*h ²	1398391,687 ± 6485790,010	769884,116 ± 287189,116

Tabla 8

Parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis bicompartimental en ejemplares caninos con CME. Estudio paralelo (Formicrodox Vs Control) por 28 días a una dosis de 10 mg/Kg al día de doxiciclina.

Parámetro	Unidad	Formicrodox	Control
k10	1/h	1 ± 0	1 ± 0
k12	1/h	0 ± 0	0 ± 0
k21	1/h	1 ± 0	1 ± 0
t1/2Alpha - Beta	h	0,69314 ± 0	0,69314 ± 0
t1/2ka	h	0,69162 ± 0,00146	0,69270 ± 0,00019
Tmax	h	0,99912 ± 0,00085	0,99974 ± 0,00011
Cmax	µg/ml	0,80607 ± 0,03300	0,56412 ± 0,24631
AUC 0-t	µg/ml*h	2,18869 ± 0,08730	1,53300 ± 0,66953
AUC 0-inf	µg/ml*h	2,18868 ± 0,08730	1,53300 ± 0,66953
AUMC	µg/ml*h ²	4,37249 ± 0,16977	3,06512 ± 1,33906

Discusión

En este estudio fue evaluada la farmacocinética de una formulación microencapsulada de doxiciclina hiclato con un recubrimiento de CMC, sacarosa y gelatina (Formicrodox) realizado en el biomodelo canino tanto en ausencia de enfermedades causadas por agentes de la familia anaplasmatáceas y hemoprotozoarios, como en ejemplares con CME. En el primer proceso se determinaron los perfiles cinéticos en un estudio piloto cruzado comparando los resultados con un control. En el segundo estudio se realizó un ensayo paralelo para determinar la cinética en condiciones de ayuno. Finalmente se llevó a cabo un estudio preclínico longitudinal en ejemplares caninos con CME, en el cual se evaluó la farmacocinética de la molécula microencapsulada con administración oral a una dosis de 10 mg/Kg durante 28 días de tratamiento comparándola con un control (doxiciclina hiclato comercial).

Ensayos preliminares con una sola intervención (ensayo piloto)

Estudio piloto de seguridad cruzado

En la primera parte de este estudio se determinaron algunos datos farmacocinéticos luego de la ingesta de alimentos. El ayuno no se tuvo en cuenta (Kukanich & Kukanich, 2015; Saivin & Houin, 1988; Saux, Mosser, Pontagnier, & Leng, 1983). En el estudio cruzado, las concentraciones plasmáticas de doxiciclina de los dos tratamientos y en los dos momentos evaluados, fueron detectadas en los primeros 12 minutos posteriores a la intervención. Durante todo el tiempo de la investigación, los valores obtenidos se encontraron por encima de la MIC establecida para el manejo de la CME (0,03 µg/ml). El valor $AUC_{0-24}:MIC$ obtenido para Formicrodox en este ensayo fue de 215,6; mientras que para el control fue de 274,3. Este parámetro farmacodinámico se relaciona con la actividad bacteriostática de antibióticos concentración-dependientes. Existen

estudios clínicos que apoyan la necesidad de obtener cocientes iguales o superiores a 125 para patologías bacterianas, o mayores a 75 en infecciones por bacterias Gram negativas como etiología de infecciones respiratorias (Fowler et al., 2004; Soriano-García, 2010). Los resultados demostraron que los índices obtenidos en el primer proceso se podrían relacionar con una óptima capacidad bacteriostática del antibiótico, tanto en la presentación microencapsulada como en el control. El parámetro $AUC_{0-24}:MIC$ (área bajo la curva calculada sobre la concentración mínima inhibitoria por 24 horas) es un buen indicador de correlación de actividad de los antibióticos concentración-dependientes, ya que predice su eficacia terapéutica (Andes & Craig, 2007; Gunderson, Ross, Ibrahim, & Rotschafer, 2001; Kitamura, Yoshida, Kusama, & Sugiyama, 2014; Soriano-García, 2010; Sykes & Papich, 2013). La farmacodinamia de la doxiciclina depende del tiempo en que la concentración del antibiótico sea superior a la MIC, por lo tanto, $AUC_{0-24}:MIC$ es el cociente más adecuado para predecir la eficacia clínica y microbiológica de las tetraciclinas (Gunderson et al., 2001; Sykes & Papich, 2013).

Luego de 36 a 48 horas de la intervención los niveles de doxiciclina, no fueron detectados en ninguno de los grupos intervenidos, este descenso fue similar a lo reportado en investigaciones usando dosis de 5 mg/Kg por vía IV, en donde el último dato registrado obtenido fue a las 48 horas con un nivel de $0,14 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ de doxiciclina (Wilson, Kemp, Kitzman, & Goetsch, 1988); y superior a lo reportado en 1990 con niveles de detección de $0,33 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$ a las 32 horas (Riond et al., 1990). La concentración máxima (C_{max}) se estableció en $0,417 \pm 0,067 \mu\text{g/ml}$ para la intervención Formicrodox y en $0,518 \pm 0,274 \mu\text{g/ml}$ para el control, sin embargo estos datos fueron inferiores a lo reportado en otros estudios. En una investigación realizada por Michel y colaboradores, con 5 ejemplares caninos a los cuales se les administró doxiciclina oral recubierta de cápsulas de gelatina a una dosis de 10 mg/Kg, se reportaron concentraciones máximas entre 2,5

hasta 5,2 $\mu\text{g/ml}$ de antibiótico (Michel et al., 1979). De igual manera en México, Arciniegas y colaboradores realizaron un ensayo clínico en perros con una formulación de larga acción oral de doxiciclina hiclato (utilizando diferentes proporciones de excipientes) obteniendo niveles séricos del fármaco entre los rangos de $2,41 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$ hasta $4,11 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ (Arciniegas Ruiz et al., 2015). A pesar de la diferencia, en estas investigaciones se utilizaron metodologías de detección diferente al presente estudio. En estas investigaciones fueron establecidas las concentraciones de doxiciclina sérica gracias a la adaptación de metodologías estadísticas usando la técnica de medición de halos de inhibición en cultivos de diferentes microorganismos (Arciniegas Ruiz et al., 2015; Michel et al., 1979). A pesar de esto Kukanich y colaboradores reportaron un nivel en un rango de 1,86–2,95 $\mu\text{g/ml}$ (grupo control) luego de la administración de 300 mg como dosis total de doxiciclina oral a ejemplares caninos utilizando como medida de detección la cromatografía líquida y espectrometría de masas (Kukanich & Kukanich, 2015), este podría ser un resultado más comparable, sin embargo se sigue considerando mayor al obtenido en comparación al presente estudio. Posterior a la intervención se pudo establecer que el tiempo que tardó la concentración plasmática de doxiciclina en reducirse a la mitad de sus niveles iniciales fue de $8,954 \pm 7,302$ horas para el tratamiento microencapsulado, mientras que para el control fue de $8,465 \pm 0,192$ horas. Estos valores, próximos entre ellos, son inferiores a los reportados por Michel y colaboradores, en donde se establecieron datos de tiempo de vida media en ejemplares caninos con formulaciones orales de doxiciclina en un rango de 10,7 a 13,2 horas (Michel et al., 1979); y por Kukanich y colaboradores, para el grupo control en donde encontraron valores de $t_{1/2}$ de 14,2 horas en promedio (Kukanich & Kukanich, 2015). De igual manera el tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima del fármaco en la sangre después de la administración por vía extravascular para Formicrodox fue de $6,5 \pm 7,778$, mientras que para el control fue de $6 \pm 2,828$. El resultado

obtenido fue mayor a lo reportado en otros estudios de administración oral de doxiciclina en ejemplares caninos, en donde se obtuvieron niveles de detección de T_{max} de 1,2 horas para un grupo control en el estudio realizado por Kukanich y colaboradores (Kukanich & Kukanich, 2015); de 2,3 a 4,7 horas (Michel et al., 1979), y de 2,03 a 4,11 horas en ensayos clínicos realizados en México por Arciniegas y colaboradores (Arciniegas Ruiz et al., 2015). Todos estos datos obtenidos indicaron que pudo haberse dado algún proceso de disminución en la biodisponibilidad debido a la ingesta en conjunto con comida. Según diferentes autores, el área bajo la curva de concentración/tiempo (AUC) de algunos antibióticos se puede reducir hasta un 20% cuando es suministrada en conjunto con algunos tipos de alimentos (Saivin & Houin, 1988; Welling, P. G., Huang, H., Koch, P. A., Craig, W. A., & Madsen, 1977). Uno de los parámetros que se observaron en los cromatogramas fue que al analizar la tendencia, se pudo apreciar que el tratamiento microencapsulado presentó concentraciones más sostenidas (indicado por la amplitud de la campana), comparado con el control; este resultado es clásico de formulaciones de liberación lenta (Ahsan et al., 2002). En el estudio realizado por Gallego y colaboradores (Gallego-Londoño, 2017) se pudo establecer que las micropartículas diseñadas poseían una superficie continua y suave, sin fisuras o grietas aparentes (Gallego-Londoño, 2017). Esta superficie externa lisa se le atribuyó a la adición de CMC (Su et al., 2008). Es posible que la integridad de la pared previamente diseñada, haya permitió una mejor retención del principio activo, lo que es deseable para garantizar permeabilidad y en consecuencia mayor protección del microencapsulado frente a las condiciones a las que fue sometido en el biomodelo canino (mucosa oral, gástrica y duodenal) (Campos Toledo, Gomez Da Costa, Joyce Maria Silva, Machado Azevedo, Yoshida, & Vilela Borges, 2015).

Debido a estos resultados se determinó la importancia de realizar un segundo estudio de tipo paralelo para analizar la cinética de la doxiciclina en condiciones de ayuno con los mismos ejemplares utilizados en el ensayo cruzado.

Estudio piloto de seguridad paralelo

En el segundo proceso de investigación se determinaron algunos datos cinéticos sin ingesta de alimentos. Al igual que en el estudio piloto cruzado, las concentraciones plasmáticas de doxiciclina en los dos tratamientos, fueron detectados luego de una hora, posterior a la ingesta de las formulaciones, y hasta las 36 a 48 horas. Durante todo el tiempo detectable, los valores obtenidos se encontraron por encima de la MIC (0,03 $\mu\text{g/ml}$). La concentración máxima (C_{max}) se estableció en 1,233 $\mu\text{g/ml}$ para el tratamiento microencapsulado, mientras que para el control se obtuvo un valor de 1,081 $\mu\text{g/ml}$. Estos datos representaron una mayor detección de doxiciclina sérica que en el primer momento. Sin embargo, los índices C_{max} , tiempo de vida media y tiempo máximo obtenidos, continuaron siendo inferiores a los reportados en otros estudios. Las metodologías de detección reportadas en el estado del arte, corresponden principalmente a procesos indirectos (medición de halos de inhibición en cultivos bacterianos), las cuales podrían tender en cierto grado a la subjetividad, y pueden afectar la especificidad de los resultados obtenidos si son comparadas con técnicas cromatográficas. Estos métodos pueden ser menos confiables que los análisis por cromatografía acoplada a masas. A pesar de esto los datos obtenidos en este segundo ensayo son cercanos a los reportados por Kukanich y colaboradores, quienes utilizaron como mecanismos de detección la cromatografía líquida y espectrometría de masas (Kukanich & Kukanich, 2015) igual que en la presente investigación. El valor $\text{AUC}_{0-24:\text{MIC}}$ obtenido para Formicrodox en este ensayo fue de 228,6; mientras que para el control fue de 218,6. De igual manera que en el primer proceso

del estudio, los resultados podrían inferir, una posible óptima capacidad bacteriostática del antibiótico, tanto en la presentación microencapsulada como en el control (Gunderson et al., 2001). Como limitantes, en este primer estudio se pudo haber presentado algún grado de sesgo por el tipo de reclutamiento realizado.

Ensayo paralelo longitudinal en el manejo de la CME (Estudio preclínico de seguridad)

Ensayos preclínico de seguridad, paralelo y longitudinal en el manejo de la CME con múltiples administraciones orales, a dosis terapéuticas (10 mg/Kg cada 24 horas) de doxiciclina, durante 28 días

En la última parte de este estudio se determinaron algunos datos farmacocinéticos durante un tratamiento completo de 28 días con Formicrodox comparándola con un control de doxiciclina hiclato comercial para el tratamiento de la CME en condiciones de ayuno (debido a los datos preliminarmente obtenidos). En este caso las concentraciones plasmáticas de doxiciclina en los dos tratamientos y en los dos momentos fueron detectados a los 30 minutos posteriores a la ingesta de las formulaciones, y durante los 28 días posteriores, abarcando la totalidad del estudio. Durante todo el tiempo detectable, los valores obtenidos se encontraron por encima de la MIC establecida para el tratamiento de la CME (0,03 $\mu\text{g/ml}$). De igual manera distintos indicadores farmacocinéticos aumentaron al compararlos con los estudios piloto, logrando una C_{max} con niveles de $3,555 \pm 1,678 \mu\text{g/ml}$ para el tratamiento microencapsulado y de $3,211 \pm 4,053 \mu\text{g/ml}$ para el control, sin embargo, no son considerados superiores a lo publicado en diversos estudios similares en donde se utilizaban métodos indirectos. En este ensayo se logró obtener detecciones en uno de los ejemplares caninos del grupo control de hasta $5,09 \mu\text{g/ml}$; los cuales fueron similares

a los reportados en estudios de cinética de doxiciclina en el biomodelo canino (Arciniegas Ruiz et al., 2015; Kukanich & Kukanich, 2015; Michel et al., 1979). El valor $AUC_{0-24}:MIC$ obtenido para Formicrodox en este ensayo fue de 791,05; mientras que para el control fue de 1789,6. Los valores farmacodinámicos en este tercer proceso de investigación, (igual que en los estudios preliminares) demostraron una posible óptima capacidad bacteriostática del antibiótico, tanto en la presentación microencapsulada como en el control (Gunderson et al., 2001). El tiempo en el que se alcanzó la concentración máxima (C_{max}) fue similar que en otros estudios publicados. Para el microencapsulado el T_{max} obtenido fue de 4 horas; este dato fue similar al reportado por Michel y colaboradores, y Arciniegas y colaboradores (Arciniegas Ruiz et al., 2015; Michel et al., 1979). El tiempo de vida media de absorción fue bajo en comparación con otros estudios, sin embargo en una publicación realizada por Kikuvi y colaboradores en el año 2001, se investigó la cinética de una tetraciclina de larga acción en perros sanos e infectados con *Ehrlichia canis*, reportando un tiempo de vida media de absorción inferior en ejemplares infectados con el microorganismo en comparación a los resultados obtenidos en ejemplares sanos ($1,13 \pm 0,15$ y $0,19 \pm 0,07$ horas respectivamente); esto es consecuente con la presente investigación, ya que en los estudios piloto, el tiempo de vida media, fue mayor que en los parámetros cinéticos que en el estudio con los animales enfermos (Kikuvi, G.M., Mitema, E.S., Buoro, 2001). Un factor que dificultó la comparación de indicadores farmacocinéticos con el presente estudio es que gran parte de lo publicado se encuentra reportado como parámetros cinéticos a una única dosis, o por vías de administración diferentes. Bigwood y colaboradores en el año 2003 determinaron valores de parámetros farmacocinéticos posteriores a una administración de doxiciclina con infusión continua de 0,10 mg/kg/h en 6 perros, mostrando datos similares a los de la presente investigación. Uno de estos datos obtenidos similares, correspondió al parámetro de área bajo la curva en el periodo

completo de tiempo (de tiempo cero a tiempo infinito), que infiere la biodisponibilidad del fármaco (concentración del fármaco en función del tiempo). Bigwood y colaboradores obtuvieron niveles de AUC de $12,09 \pm 3,22$ en plasma y de $2,09 \pm 0,21$ en líquido intersticial (Bidgood & Papich, 2003), mientras que en el presente estudio se obtuvieron valores de $2,18 \pm 0,087$ para el microencapsulado y de $1,53 \pm 0,66$ para el grupo control en sangre (en el análisis bicompartimental). Bigwood y colaboradores utilizaron metodologías para incluir en los resultados porcentajes de concentraciones de doxiciclina acoplada a proteínas plasmáticas (Bidgood & Papich, 2003), en comparación, el presente ensayo longitudinal pudo haber tenido limitaciones en este sentido ya que no fueron tenidos en cuenta indicadores de unión a dichas estructuras. Sin embargo, para el análisis de cada muestra se utilizó una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico, esta mezcla (que precipita proteínas) permitió el análisis de la doxiciclina total sin diferenciar fracción libre y unida a proteínas. Michel y colaboradores utilizaron cápsulas de gelatina para la administración de doxiciclina (Michel et al., 1979), esto fue similar a la presente investigación. Para los tratamientos con el microencapsulado fue necesario empacar el producto en este tipo de cápsulas ya que la formulación que fue obtenida por el método de secado por aspersión correspondió a un polvo seco, con un grado de porcentaje de humedad por debajo del 5,4% (Gallego-Londoño, 2017). A pesar que el Formicrodox fue elaborado con CMC (carbohidrato reportado con propiedades de protección contra la digestión ácida gástrica, lo que es deseable para fármacos de liberación controlada) (Su et al., 2008) y teniendo en cuenta que los estudios preliminares demostraron que la formulación liberaba en condiciones *in vitro* una cantidad de fármaco menor en medio ácido, se podría sugerir que gracias al microencapsulado, la doxiciclina que alcanzó la mucosa intestinal (con el fin de ser absorbida), pudo haber representado un mayor volumen del antibiótico en comparación con doxiciclina libre. En estudios preliminares

in vitro el microencapsulado obtenido contó con características higroscópicas (Gallego-Londoño, 2017; Mazabel-Riera, 2017), debido a esto las micropartículas, luego de la administración oral, podrían haberse expandido en contacto con los líquidos gástricos, con una consecuente ruptura con liberación del contenido (doxiciclina) de manera prematura en la mucosa del estómago, esto es considerado indeseable por los efectos gastrolesivos e irritantes de este antibiótico. Por lo tanto, se utilizaron cápsulas de gelatina para la administración de la formulación microencapsulada (en promedio de 4 a 6 capsulas al día por animal intervenido). A pesar de esto, el vómito no fue significativo luego de comparar los dos grupos. En el caso del estudio longitudinal de ejemplares con detección de *Ehrlichia canis*, el número de perros que contaron con los criterios de inclusión, y que no tenían criterios de exclusión, correspondió a un 3% (5/198) de la totalidad de los ejemplares muestreados. Esto pudo haber sido una limitante, ya que se presentó alto grado de variabilidad en algunos datos obtenidos posiblemente dado por el bajo número de ejemplares que fueron reclutados en las investigaciones. Por último, cabe resaltar que la integridad de la pared del microencapsulado es considerado importante con el fin de asegurar una mejor retención del activo; además, una superficie suave es reportado como una característica deseable para garantizar una menor permeabilidad del vapor de agua y de oxígeno, generando mayor protección de la sustancia encapsulada frente a condiciones ambientales (Gallego-Londoño, 2017). En este mismo sentido, es importante que para futuras investigaciones se analicen y caractericen estas propiedades, con la intención de identificar posibles asociaciones entre su morfología y la liberación del fármaco, lo cual no fue parte del alcance de la presente investigación. Por lo tanto deberían plantearse para el futuro, investigaciones que comprendan el estudio con el uso de otro tipo de alternativas de liberación controlada de doxiciclina, y formulaciones con propiedades físico-químicas diferentes.

Conclusiones

El microencapsulado no tuvo diferencias estadísticamente significativas con la doxiciclina hclato comercial luego del estudio de comparación de parámetros farmacocinéticos. Formicrodox podría ser una estrategia útil ya que se puede elaborar con componentes de bajo costo y de fácil acceso. Se deben realizar estudios adicionales con el fin de optimizar el proceso de elaboración, mantenimiento y administración del producto innovador para facilitar el tratamiento en los ensayos clínicos. La detección sérica de doxiciclina del microencapsulado siempre estuvo por encima de la MIC, y el en todos los ensayos realizados se consideró alto al compararlo con lo publicado, lo cual es deseable. Algunos resultados farmacocinéticos obtenidos en los tres ensayos (piloto cruzado y paralelo; y preclínico), se consideraron inferiores en comparación con publicaciones donde se utilizan metodologías indirectas (como la medición de halos de inhibición). Gracias a la metodología utilizada en el presente estudio (cromatografía acoplada a espectrometría de masas), los datos obtenidos podrían representar una mayor plausibilidad en los valores de detección, ya que el uso de técnicas indirectas para este tipo de investigaciones podría sobreestimar las concentraciones reportadas. El suministro de alimento pudo disminuir la absorción y la biodisponibilidad de la doxiciclina, sin embargo es posible que no haya afectación en el manejo de la CME debido a que las concentraciones séricas siempre se consideraron óptimas, indicadas por el cociente $AUC_{0-24}:MIC$. En los estudios realizados se pudo haber presentado una alta variabilidad entre los pacientes intervenidos al interior de cada grupo (Formicrodox y Control), esto se pudo haber dado posiblemente por el número limitado de ejemplares estudiados. Finalmente se debería escalar a estudios multicéntricos y realizar investigaciones de eficiencia y eficacia, puesto que el microencapsulado podría cumplir con estándares similares a moléculas que se encuentran actualmente en el mercado.

Referencias

- Aguiar, D. M., Zhang, X., Melo, A. L. T., Pacheco, T. A., Meneses, A. M. C., Camargo, L. M. A., ... Labruna, M. B. (2013). Genetic diversity of Ehrlichia canis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, *164*, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.015>
- Ahsan, F., Rivas, I. P., Khan, M. A., & Torres Suárez, A. I. (2002). Targeting to macrophages: Role of physicochemical properties of particulate carriers - Liposomes and microspheres - On the phagocytosis by macrophages. *Journal of Controlled Release*, *79*(1–3), 29–40. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00549-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00549-1)
- Aktas, M., & Özübek, S. (2019). Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Genetic diversity of Ehrlichia canis in dogs from Turkey inferred by TRP36 sequence analysis and phylogeny. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *64*, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.003>
- Alfonso, G., Guerrero, M., & Lorenzana-Jiménez, M. (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM*, *52*(6), 260–264.
- Almazán, C., González-Álvarez, V. H., Fernández de Mera, I. G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & de la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *7*, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>
- Almeida, A., Marcili, A., Leite, R., Nieri-Bastos, F., Domingues, L., Martins, J., & Labruna, M. (2012). Coxiella symbiont in the tick Ornithodoros rostratus (Acari: Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis.*, *3*(4), 203–206.

- Almeida, A. P., Marcili, A., Leite, R. C., Nieri-Bastos, F. A., Domingues, L. N., Martins, J. R., & Labruna, M. B. (2012). Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(4), 203–206.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.02.003>
- Andes, D., & Craig, W. (2007). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tetracyclines. In C. Nightingale, P. Ambrose, G. Drusano, & T. Murakawa (Eds.), *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice* (Second edi, pp. 267–278). New York, USA: Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000286264.17198.11>
- Arciniegas Ruiz, S. M., Gutiérrez Olvera, L., Bernad Bernad, M. J., Caballero Chacón, S. D. C., Vargas Estrada, D., Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2015). Comparative pharmacokinetics of a new oral long-acting formulation of doxycycline hyclate: A canine clinical trial. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(2), 122–130.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>
- Aronson, A. (1980). Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176(10), 1061–1068.
- Barza, M., Brown, R. B., Shanks, C., Gamble, C., & Weinstein, L. (1975). Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8(6), 713–720.
<https://doi.org/10.1128/AAC.8.6.713>
- Bidgood, T. L., & Papich, M. G. (2003). Comparison of plasma and interstitial fluid concentrations of doxycycline and meropenem following constant rate intravenous infusion in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 64(8), 1040–1046.

<https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.1040>

- Bouza-Mora, L., Dolz, G., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J. J., Salazar-Sánchez, 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>
- Cabrera, A. (2018). *Detección molecular de microorganismos transmitidos por ectoparásitos en caninos procedentes de albergues de tres municipios del Valle de Aburra , Antioquia Trabajo de grado para optar por el título de Médica Veterinaria Gloria Azucena Cabrera Jaramillo A.*
- Campos Toledo, A. A., Gomez Da Costa, Joyce Maria Silva, E. K., Machado Azevedo, V., Yoshida, M. I., & Vilela Borges, S. (2015). Physical and thermal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil microparticles. *Journal of Food Process Engineering*, 38(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12120>
- Chambers, H. E. (2007). Inhibidores de la síntesis de proteína y otros antibacterianos. In *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (Undécima e, pp. 1173–1179).
- Cicuttin, G. L., Tarragona, E. L., De Salvo, M. N., Mangold, A. J., & Nava, S. (2015). Infection with Ehrlichia canis and Anaplasma platys (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(6), 724–729. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.06.006>
- Cruz, A. C., Zwegarth, E., Ribeiro, M. F. B., Da Silveira, J. A. G., De La Fuente, J., Grubhoffer, L., ... Passos, L. M. F. (2012). New species of Ehrlichia isolated from Rhipicephalus (Boophilus) microplus shows an ortholog of the E. canis major immunogenic

- glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-291>
- Cunha, B., Sibley, C., & Ristuccia, A. (1982). Doxycycline. *Therapeutic Drug Monitoring*, 4(2), 115–135.
- de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., & Kocan, K. M. (2006). Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research*, 2, 24. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-24>
- Deck, D., & Winston, L. (2012). Tetracyclines, Macrolides, Clindamycin, Chloramphenicol, Streptogramins, & Oxazolidinones. In B. Katzung, S. Masters, & A. Trevor (Eds.), *Basic and clinical Pharmacology (LANGE Basic Science)* (12th editi, pp. 809–820). The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Del Castillo, J. (2013). Tetracyclines. In S. Giguère, J. Prescott, & P. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (Fifth Edit, pp. 257–268). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118675014>
- Feldman, B., Zinkl, Z., & Jain, N. (2000). *Schalm's veterinary hematology*.
- Fidler, I. J., & Kleinerman, E. S. (1994). Clinical application of phospholipid liposomes containing macrophage activators for therapy of cancer metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 13(3), 325–340. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0169-409X(94)90018-3)
- Fowler, C., Weisinger, B., Kahn, J., Preston, S. L., Corrado, M., & Drusano, G. L. (2004). Relationship between Fluoroquinolone Area under the Curve:Minimum Inhibitory Concentration Ratio and the Probability of Eradication of the Infecting Pathogen, in Patients

with Nosocomial Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(9), 1590–1597.

<https://doi.org/10.1086/383320>

Gallego-Londoño, V. (2017). *Desarrollo de un sistema de liberación controlada de doxiciclina a partir de dos prototipos de encapsulación: secado por aspersión y liposomas Educación ambiental y evaluación de la densidad poblacional para la conservación de los cóndores reintroducidos*. 2017. Universidad de Antioquia.

Gunderson, B. W., Ross, G. H., Ibrahim, K. H., & Rotschafer, J. C. (2001). What Do We Really Know About Antibiotic Pharmacodynamics? *Pharmacotherapy*, 21(10 Part 2), 302S-318S.

<https://doi.org/10.1592/phco.21.18.302s.33905>

Gutierrez, 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>

Hirota, K., & Terada, H. (2012). Endocytosis of Particle Formulations by Macrophages and Its Application to Clinical Treatment. *Molecular Regulation of Endocytosis Pinocytosis*, 413–

428. <https://doi.org/10.5772/45820>

Inokuma, H., Fujii, K., Okuda, M., Onishi, T., Beaufils, J., Raoult, D., & Brouqui, P. (2002).

Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon. *Society*, 9(5), 1132–

1136. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.1132>

Jefferies, R., Ryan, U., Muhlnickel, C., P. J. (2003). Two Species of Canine Babesia in Australia:

Detection and Characterization by PCR. *The Journal of Parasitology*, 89(2), 409–412.

[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0397:SOAUSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0397:SOAUSO]2.0.CO;2)

- Kikuvi, G.M., Mitema, E.S., Buoro, I. B. (2001). The pharmacokinetics of a long-acting oxytetracycline formulation in healthy dogs and in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Research Communications.*, 25(5), 391–400.
- Kitamura, Y., Yoshida, K., Kusama, M., & Sugiyama, Y. (2014). A Proposal of a Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) Index Map for Selecting an Optimal PK/PD Index from Conventional Indices (AUC/MIC, C_{max}/MIC, and TAM) for Antibiotics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(6), 455–462. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-14-rg-013>
- Kukanich, K., & Kukanich, B. (2014). The effect of sucralfate tablets vs . suspension on oral doxycycline absorption in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1–5. <https://doi.org/10.1111/jvp.12165>
- Kukanich, K., & Kukanich, B. (2015). The effect of sucralfate tablets vs. suspension on oral doxycycline absorption in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38(2), 169–173. <https://doi.org/10.1111/jvp.12165>
- Latimer, K., Prasse, K., & Mahaffey, E. (2005). *Patología clínico veterinaria*. (In-Multime).
- Lemos, M. (2002). Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. In L. Botana, M. Landoni, & T. Martín-Jiménez (Eds.), *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (1st ed. Ma, pp. 468–483). Mc Graw-Hill Interamericana de España, SAU.
- Mazabel-Riera, E. (2017). *Comparación de concentraciones plasmáticas de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hclato in vitro y en biomodelo canino mediante HPLC*. Corporación Universitaria Lasallista.

- Michel, G., Mosser, J., & Fauran, F. (1979). Serum kinetics of doxycycline polyphosphate in dogs. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 4(1), 43–48.
<https://doi.org/10.1007/BF03189398>
- MJ, D., Mackin, A., & Littlewood, J. (2000). *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion*. (M. B. S. A. V. Association., Ed.).
- Neer, T., Breitschwerdt, E., Greene, R., & Lappin, M. (2002). ACVIM Consensus Statement. *J Vet Intern Med*, 16, 309–315.
- Nelson, M. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x>
- Peleg, O., Baneth, G., Eyal, O., Inbar, J., & Harrus, S. (2010). Multiplex real-time qPCR for the detection of Ehrlichia canis and Babesia canis vogeli. *Veterinary Parasitology*, 173(3–4), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.039>
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 110–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>
- Posada-Zapata, J., Cabrera J, A., González–Alvarez, D., Rodas G, J., Monsalve B, S., & Londoño B, A. (2017). Identificación de bacterias de la familia Anaplasmataceae en un albergue canino del municipio de Caldas, Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), 6014.
<https://doi.org/10.21897/rmvz.1071>
- Prince, L. K., Shah, A. A., Martinez, L. J., & Moran, K. A. (2007). Ehrlichiosis: making the diagnosis in the acute setting. *Southern Medical Journal*, 100(8), 825–828.

<https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e31804aa1ad>

Rikihisa, Y. (2010). Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*, *167*, 155–166.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.017>

Riond, J. L., Vaden, S. L., & Riviere, J. E. (1990). Comparative Pharmacokinetics of Doxycycline in Cats and Dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *13*(4), 415–424.

Saivin, S., & Houin, G. (1988). Clinical Pharmacokinetics of Doxycycline and Minocycline. *Clinical Pharmacokinetics*, *15*(6), 355–366. <https://doi.org/10.2165/00003088-198815060-00001>

Saux, M., Mosser, J., Pontagnier, H., & Leng, B. (1983). Pharmacokinetic study of doxycycline polyphosphate after simultaneous ingestion of milk. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *8*(1), 43–49.

Schölkens, B. Gerhards, H. Lindner, E. (1971). Circulatory effects of intravenously administered rolitetracycline and other tetracyclines in animal experiments. *Arzneimittel-Forschung*, *24*(3), 312–317. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Soriano-García, F. (2010). Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of interpretive reading of the antibiogram. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *28*(7), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.005>

Su, Y. L., Fu, Z. Y., Zhang, J. Y., Wang, W. M., Wang, H., Wang, Y. C., & Zhang, Q. J. (2008). Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder*

- Technology*, 184(1), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.08.014>
- Sykes, J. E., & Papich, M. G. (2013). Principles of antiinfective therapy. In J. E. Sykes (Ed.), *Canine and feline infectious diseases* (pp. 46–53). Elsevier Health Sciences.
- Unver, A., Perez, M., Orellana, N., Huang, H., & Rikihisa, Y. (2001). Molecular and antigenic comparison of Ehrlichia canis isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2788–2793. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2788-2793.2001>
- Villaescusa, A., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., Tesouro, M. Á., & Sainz, Á. (2015). Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with Ehrlichia canis. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 204(3), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.031>
- Waner, T., Nachum-Biala, Y., & Harrus, S. (2014). Evaluation of a commercial in-clinic point-of-care polymerase chain reaction test for Ehrlichia canis DNA in artificially infected dogs. *Veterinary Journal*, 202(3), 618–621. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.004>
- Welling, P. G., Huang, H., Koch, P. A., Craig, W. A., & Madsen, P. O. (1977). Bioavailability of ampicillin and amoxicillin in fasted and nonfasted subjects. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(4), 549–552.
- Wilson, R. C., Kemp, D. T., Kitzman, J. V., & Goetsch, D. D. (1988). Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52(1), 12–14.

Capítulo III

Seguridad de un Microencapsulado para la Liberación de Doxiciclina en el Tratamiento de la Ehrlichiosis Monocítica Canina

Introducción

Ehrlichiosis es el término utilizado para describir las enfermedades causadas por bacterias del género *Ehrlichia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). Un total de seis especies de *Ehrlichia* han sido reconocidas en humanos y animales: *E. canis*, *E. chaffensis*, *E. ewingii*, *E. minasensis*, *E. muris* y *E. ruminantium* (Little, 2017), sin embargo la evidencia serológica y molecular de nuevas especies del género están siendo rutinariamente reportadas. La erlichiosis monocítica canina (CME) es una enfermedad que afecta principalmente a perros domésticos y ha sido demostrada su circulación en humanos y fauna silvestre (Bouza-Mora et al., 2017; Perez et al., 2006; Prince et al., 2007; Unver et al., 2001). La CME es una enfermedad causada por la bacteria *Ehrlichia canis*, microorganismo intracelular Gram-negativo perteneciente al subgrupo α -Proteobacteria, orden Rickettsiales y a la familia Anaplasmataceae. En caninos, la patogénesis de la enfermedad depende de varios factores como el tamaño del inóculo, la cepa infectante, el estado inmunológico y la presencia de coinfecciones. Actualmente para el tratamiento de la CME se recomienda el manejo con antibióticos de la familia de las tetraciclinas, principalmente la doxiciclina. Sobre este antibiótico han sido publicados muchos estudios que demuestran su efectividad bacteriostática (Brouqui & Raoult, 1990; Donatien & Lestoquard, 1937; Eddlestone et al., 2007; Hidrón et al., 2014; Little, 2017; McClure et al., 2010). Aunque las tetraciclinas son consideradas seguras, no están exentas de reacciones adversas en humanos y animales (Sumano & Ocampo, 2006), y ha sido reportada su toxicidad en diferentes biomodelos (Chiers et al., 2004; Riond et al., 1990; Schölkens, B. Gerhards, H. Lindner, 1971). En general, estos efectos están relacionados con sus propiedades irritantes,

entre los que se consideran más comunes los efectos gastrolesivos con presencia de vómito (Schulz et al., 2011) y diarrea, abscesos asépticos después de una aplicación parenteral y la alteración de la microbiota intestinal (Bartlett et al., 1975), quelación del calcio en sangre, intestinos y huesos en crecimiento, y posibles efectos tóxicos sobre las células hepáticas y renales utilizando altas dosis (Lepper MH, Zimmerman HJ, Carroll G, Caldwell ER Jr, Spies HW, Wolfe CK, 1951). Además, la doxiciclina está contraindicada en hembras gestantes por ser clasificada como teratogénica (Sumano & Ocampo, 2006). Se podría considerar el vómito como la reacción adversa más común, ya que se ha demostrado la presencia de este efecto gastrolesivo en un 18,3% de los perros a los que se les trató con dosis terapéuticas (Schulz et al., 2011). Para contrarrestar estos efectos, una estrategia que ha sido implementada en las últimas décadas son los sistemas microencapsulados, estos tienen como finalidad conseguir una mejor optimización en la liberación del principio activo por medio de mecanismos de liberación controlada (Torchilin, 2000). El presente estudio pretende demostrar conceptual y metodológicamente la seguridad de una nueva formulación microencapsulada para la liberación de doxiciclina (Formicrodox) en el tratamiento de la CME en perros infectados naturalmente.

Metodología

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para Experimentación con Animales de la Corporación Universitaria Lasallista Acta 06 del 8 de junio del 2013; siguiendo las normas estipuladas por el Código de Ética (COMVEZCOL); Capítulo VI de la ley 84 de 1989; Artículo III de la ley 1774 del 2016 y Capítulo VI, título 3, de la ley 576 del 2000 de la República de

Colombia. A los dueños de los albergues caninos incluidos en este estudio se les explicó el tipo de estudio y se obtuvo su consentimiento informado.

Diseño del ensayo clínico de seguridad

Se estudió la seguridad de una formulación oral microencapsulada para la liberación de doxiciclina (compuesto de sacarosa, gelatina y carboximetilcelulosa) (Formicrodox) en el tratamiento de CME, medido en el número de eventos de vómito como desenlace primario, cambios hematológicos como desenlace secundario e inferencia bacteriostática como desenlace terciario durante el tratamiento en un tiempo de 28 días, realizado en ejemplares caninos portadores de *Ehrlichia canis* procedentes de albergues caninos del municipio de Caldas, Antioquia - Colombia. Un estudio explicativo de grupos paralelos de equivalencia, unicéntrico, triple ciego y con asignación aleatoria.

Criterios de inclusión

Los perros elegibles solo ingresaron al estudio una vez que el dueño del albergue de origen diera su consentimiento informado. Para ser elegible un perro tenía que estar en una edad comprendida entre uno y 12 años, con infección por *Ehrlichia canis* confirmada por detección molecular con qPCR y PCR (Almazán et al., 2016; Cruz et al., 2012; Peleg et al., 2010) y no tener ninguno de los criterios de exclusión.

Criterios de exclusión

Como criterios de exclusión se tuvo en cuenta la coinfección por hemoprotozoarios caninos (*Babesia spp*, *Hepatozoon spp*) (Almeida et al., 2012; Jefferies. R, Ryan. U, Muhlnickel. C, 2003)

y por *Anaplasma platys* confirmada por detección molecular (Almazán et al., 2016; Peleg et al., 2010). Los animales confirmados molecularmente como positivos a *Ehrlichia canis*, pudieron haber sido excluidos del estudio, luego de realizarles chequeo en sus historias clínicas para determinar antecedentes en el último mes de terapia de quimioprofilaxis con tetraciclinas, historia de hipersensibilidad a antibióticos, cambios evidentes y repetidos en las constantes fisiológicas reportados al chequeo médico veterinario (pulso inconstante, anormalidades en los sonidos cardiacos y respiratorios y alteración en la saturación de oxígeno en la sangre).

Reclutamiento de los ejemplares caninos a intervenir

Sitios de estudio y toma de muestras

Fueron muestreados y analizados 198 ejemplares caninos obtenidos durante los meses de julio de 2017 a febrero de 2018 y provenientes de los albergues caninos “El Hogar de Alicia” localizado en la vereda La Miel y el “Albergue Municipal de Caldas” en la vereda La Salada, a 2.5 y 7 Km respectivamente del perímetro urbano del municipio de Caldas, Antioquia. Se tomaron muestras de sangre con jeringas estériles de 3 ml y agujas de calibre 21, y posteriormente fueron depositadas en tubos con (EDTA) y sin anticoagulante. Las muestras fueron transportadas y procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico Veterinario humano “Marco Antonio Serna” f.s.c de la Corporación Universitaria Lasallista. Las muestras de hematología fueron procesadas de manera inmediata y las de diagnóstico molecular fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Detección molecular como criterio de inclusión

Para la extracción de DNA, se tomaron muestras de sangre en los ejemplares caninos estudiados con el anticoagulante EDTA. Para este propósito se usó el estuche comercial de la marca Thermo

scientific tissue DNA purification® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se cuantificó y midió la pureza del DNA por medio de espectrofotometría con las relaciones 260/230 y 260/280 (Nanodrop ND-2000®, Thermo Scientific, Wilmington, EE. UU). A los ejemplares que cumplieron los criterios de inclusión y que ingresaron al estudio, se les tomó de nuevo muestras de sangre con EDTA, y les fue realizado nuevamente extracción de DNA. Al producto obtenido le fue cuantificado y medido su pureza por medio de un espectrofotómetro IMPLEN NP80 (Versión NPOS 3.1d build 13220). Para el reclutamiento de los animales, fueron utilizados los cebadores EC16S F (5'-TCGCTATTAGATGAGCCTACGT-3') y EC16S R (5'-GAGTCTGGACCGTATCTCAGT-3') (Cabrera, 2018; Peleg et al., 2010; Trevor Waner et al., 2014) que amplifican un segmento del gen 16S rRNA de la familia Anaplasmataceae. El volumen de reacción final fue de 20 µl, constituido por 10 µl del reactivo SensiFAST SYBR® No-ROX mix (2x), 0,8 µM de cada cebador, 6,4 µl de agua ultra pura y 2 µl del DNA con una concentración final de 33,33 ng/µL. El equipo utilizado para este protocolo fue un termociclador de marca Qiagen® modelo Rotor-Gene Q 5PLEX HRM Real Time PCR, el cual fue programado con los siguientes ciclos: una desnaturalización inicial de 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 5 segundos, extensión a 65°C durante 10 segundos y amplificación a 72°C por 5 segundos. Las muestras se consideraron positivas con niveles de ciclo umbral (Cycle threshold, Ct) menor a 35 ciclos y con productos amplificados cercanos a la misma temperatura de disociación del control positivo, temperatura de fusión (TM) (65-95°C) y Threshold 0.03932. También se agregó una curva de fusión al final de esta prueba para verificar la especificidad y garantizar la eficiencia de los cebadores. El control positivo fue DNA de organismos relacionados con el agente *Anaplasma marginale*. Con el fin de garantizar la ausencia de contaminación de reactivos, enzimas y muestras problemas, fue incluido en cada ensayo un tubo que contenía todos

los componentes de PCR-Mix sin DNA, la cual fue reemplazada por una cantidad equivalente de agua ultra pura (Cabrera, 2018). Para comprobar los resultados se usaron los iniciadores del gen 16S rRNA, 16SANA-F (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACG-3') y 16sANA-R (5'-AGTTTGCCGGGACTTCTTCTGTA-3') (Almazán et al., 2016; Cabrera, 2018; De la Fuente et al., 2006) que también amplifican para microorganismos de la familia Anaplasmataceae. El volumen de reacción final fue de 50 µl usando: (34,75 µl) de agua ultra pura, TopTaq PCR Buffer (5 µl), 10x CoralLoad (5 µl), dNTPs mix 10 mM (1µl), cada cebador a 10 mM (0,5 µl), TopTaq DNA Polimerase (0,25 µl), y DNA problema (2 µl). Los parámetros del termociclador optimizado fueron de 94°C/3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/30 segundos, extensión de recorrido a 60°C/30 segundos, amplificación 72°C/45 segundos y una extensión final de 72°C/10 minutos. El fragmento deseado era de 421 pb. Como control positivo se comparó con DNA del microorganismo *Anaplasma marginale*. A los animales considerados positivos, a microorganismos de la familia Anaplasmataceae por amplificación, análisis de las curvas de disociación, y secuenciación de los productos obtenidos, se les realizó PCR del gen dsb, dsbF2 (5'-CTTAGTAATACTAGTGGCAAGTTTTCCAC-3') y dsbR2 (5'-GTTGATATATCAGCTGCACCACCG-3'), el tamaño del amplicón esperado fue de 684 pb (Cabrera, 2018; Cruz et al., 2012). El volumen de reacción final fue de 26 µl en el que se utilizaron (19,4 µl) agua ultra pura, 10x NH4 Buffer (2,5 µl), MgCl2 solution 10 (0,75µl), dNTPs mix 10 mM (0,25 µl), cada cebador 10 mM (0,5 µl), Biolase DNA Polimerase (0,1 µl), y DNA problema (2 µl). El termociclador fue optimizado a 95°C/2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C/30 segundos, extensión de recorrido a 62°C/30 segundos, amplificación 72°C/45 segundos y una extensión final de 72°C/5 minutos. Como control positivo se comparó con DNA del microorganismo *Ehrlichia canis*.

Gen	Primer	Secuencia	pb	Referencia
16S	EC16S F	5'-TCGCTATTAGATGAGCCTACGT-3'	124	(Cabrera, 2018; Peleg et al., 2010; Trevor Waner et al., 2014)
	EC16S R	5'-GAGTCTGGACCGTATCTCAGT-3'		
rRNA	16s ANA- F	5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACG-3'	421	(Almazán et al., 2016; Cabrera, 2018; De la Fuente et al., 2006)
	16s ANA-R	5'-GAGTTTGCCGGGACTTCTTCTGTA-3'		
Dsb	dsbF2	5'-CTTAGTAATACTAGTGGCAAGTTTTCCAC-3'	684	(Cabrera, 2018; Cruz et al., 2012)
	dsbR2	5'-GTTGATATATCAGCTGCACCACCG-3'		

Detección molecular de coinfecciones como criterio de exclusión

En las muestras consideradas positivas posterior a la amplificación del gen 16S rRNA (por qPCR y PCR), fueron utilizados los iniciadores pla-HS475F (5´AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA3´) y pla-HS1198R (5´CATAGTCTGAAGTGGAGGAC3´) (Cicuttin et al., 2015; Inokuma et al., 2002; Posada-Zapata et al., 2017) con los cuales se esperaba amplificar un fragmento esperado de 724-pb. Se usó el estuche comercial de PCR Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo®), el volumen de reacción final fue de 20µl en el que se utilizaron (11,7 µl) agua ultra pura, 10x taq Buffer (4 µl), DMSO 3% (5 µl), dNTPs mix 10 mM (0,5 µl), cada cebador 10 mM (0,5 µl), Phusion Green Hot Start II DNA Polimerase (0,2 µl), y DNA problema (2 µl). Las condiciones en el termociclador fueron de 98°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 98°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Como control positivo se comparó con DNA del microorganismo *Anaplasma platys*. De igual manera fueron utilizados los iniciadores PiroA1 (5'-AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC-3') y PiroB (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3') esperando un tamaño de fragmento de 450 pb (Cabrera, 2018; Jefferies. R, Ryan. U, Muhl nickel. C, 2003). El volumen de reacción final fue

de 50 μ l: (34,75 μ l) de agua ultra pura, TopTaq PCR Buffer (5 μ l), 10x CoralLoad (5 μ l), dNTPs mix 10 mM (1 μ l), cada cebador 10 mM (0,5 μ l), TopTaq DNA Polimerase (0,25 μ l), y DNA problema (2 μ l). El programa utilizado en el termociclador comprendió una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, alineamiento de 60°C por 30 segundos, extensión de 72°C durante 45 segundos, y una amplificación final a 72°C por 10 minutos. El control positivo fue DNA de organismos relacionados con el agente *Babesia canis*.

También se usaron los primers HEP144-169 (5'-GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC-3') y HEP743-718 (5'-ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG-3') que amplifican un fragmento de gen de la subunidad 18S rRNA (574 pb) (Almeida et al., 2012; Cabrera, 2018). El volumen de reacción final fue de 26 μ l: (19,2 μ l) de agua ultra pura, BSA como adictivo (0,2 μ l), 10x NH4 Buffer (2,5 μ l), MgCl₂ solution 10 (0,75 μ l), dNTPs mix 10 mM (0,25 μ l), cada cebador 10 mM (0,5 μ l), la enzima Biolase DNA Polimerase (0,1 μ l), y DNA problema (2 μ l). El termociclador fue optimizado con el siguiente protocolo: 95°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, una extensión de recorrido a 53°C por 30 segundos, y amplificación a 72°C por 45 segundos, y una extensión final de 72°C por 5 minutos. El control positivo fue DNA relacionados con el agente *Hepatozoon canis*. Para todos los estudios de PCR convencional se utilizó un equipo Labnet Multigene® (Sigma-Aldrich), a todos los productos generados por PCR convencional se les realizó electroforesis en gel de agarosa al 2%, usando como intercalante el reactivo EZ-Visión (AMRESCO®) y un marcador de peso molecular de 100 pb. La fuente de poder se programó a 100 voltios por 40 minutos y el revelado se hizo en un fotodocumentador EnduroTM® (Labnet).

Gen	Primer	Secuencia	pb	Referencia
groEL	pla-HS475F	5'-AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA-3'	720	(Cicuttin et al., 2015;
	pla-HS1198R	5'-CATAGTCTGAAGTGGAGGAC-3'		Inokuma et al., 2002; Posada-Zapata et al., 2017)
18S rRNA	PiroA1	5'-AGG GAG CCT GAG AGA CGG CTA CC-3'	450	(Cabrera, 2018; Jefferies. R,
	PiroB	5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3'		Ryan. U, Muhl nickel. C, 2003)
	HEP2 144- 169	5'-GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC-3'	574	(Almeida et al., 2012;
	HEP2 743- 718	5'-ACAATAAAGTAAAAAACAYTTCAAAG-3'		Cabrera, 2018)

Análisis filogenético

Todos los productos positivos a *Ehrlichia* spp. *Anaplasma* spp. *Babesia* spp. y/o *Hepatozoon* spp. fueron secuenciados en la empresa MacroGen Inc., Seul, Corea. Los resultados obtenidos fueron sometidos a blast analyses (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), y alineados con secuencias homólogas disponibles en el GenBank. Las secuencias fueron editadas y analizadas filogenéticamente con el programa MEGA 7. Los métodos filogenéticos se realizaron por medio del análisis de probabilidades bayesianas con el modelo de sustitución general con tiempo reversible y el análisis por distancias genéticas con el algoritmo de neighbor-joining (Tavares, 2011) con las distancias estimadas según el modelo de sustitución de Hasegawa- Kishino-Yano con los programa MrBayes 3.1.2 y PAUP v. 4.10, respectivamente (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013).

Ensayo preclínico de seguridad

Aleatorización e intervención

Después de haber escogido a los pacientes, y luego de la firma del consentimiento informado se procedió a revisar las historias clínicas y a los ejemplares caninos se les realizó chequeo físico (frecuencia cardiaca, respiratoria, tiempo de llenado capilar). Si los animales no presentaban pulso

inconstante, anormalidades en los sonidos cardiacos y respiratorios, y alteración en la saturación de oxígeno en la sangre; los sujetos se clasificaban como elegibles para el estudio. La aleatorización se produjo a través de un esquema computarizado (aleatorización por bloques balanceados). Se generó una secuencia de asignación al azar usando números aleatorios creados por computadora para los grupos Formicrodox y Doxiciclina Hiclato Comercial como control usando el software SPSS versión 22. Ya generada la secuencia de los grupos mediante la tabla de aleatorización, se ocultó la secuencia de asignación en sobres opacos, sellados y enumerados. Estos sobres fueron guardados en el laboratorio de diagnóstico clínico veterinario de la Corporación Universitaria Lasallista y sólo tuvo acceso a ellos el médico veterinario quien suministró los tratamientos. Los ejemplares escogidos para el estudio fueron transportados a las instalaciones de la Corporación Universitaria Lasallista y 15 días antes de la intervención fueron desparasitados con Fluralaner, Febantel, Prazicuantel y Pamoato de Pirantel. Los animales fueron confinados en guacales de metal usados para hospitalización, lo suficientemente amplios para que contaran con movimiento y con bandeja metálica inferior para los desechos. Todos los perros recibieron el mismo tipo de alimento (adaptado desde una semana anterior al ensayo) y agua a voluntad. Se utilizó el condicionamiento operante con premios en el momento de la obtención de las muestras. La intervención tuvo una duración de 28 días según lo estipulado como tratamiento con doxiciclina para el tratamiento de la CME (Neer et al., 2002), para cada experimento el tiempo 0 de administración del fármaco se designó como tratamiento a las 0 horas. Se realizaron las intervenciones en dos grupos de manera paralela. La dosis establecida para los dos grupos fue de 10 mg/Kg vía oral, la cual fue establecida en estudios preliminares (Mazabel-Riera, 2017). Durante el estudio se obtuvieron muestras de sangre (3 ml) mediante venopunción a las 0, 0.1 (6 minutos), 0.2 (12 minutos), 0.5 (30 minutos), 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 240 (10 d), 360 (15d), 480 (20d)

y 672 horas (28d). Los productos fueron suministrados por un médico veterinario quien fue el encargado de la administración de los tratamientos semanalmente, este funcionario no hizo parte del procesamiento de las muestras ni del análisis de los datos. La medicación empezó el día 10 de marzo y culminó el día 7 de abril de 2018. Los tratamientos fueron suministrados en ayunas, y dos horas posteriores a la administración de los tratamientos se le ofrecía comida a los ejemplares. Los perros recibieron observación constante por parte del personal veterinario de la institución, a estos animales se les otorgaron paseos de 30 minutos en promedio 3 veces al día, estos momentos fueron aprovechados para evaluar comportamientos o indicadores físicos que pudiesen estar relacionados con los efectos adversos posibles, reportados luego del uso de doxiciclina bajo dosis terapéuticas.

Desenlaces

Desenlace primario:

Eventos de vómito durante el tratamiento. Un evento vómito se estableció como la expulsión de contenido gástrico por la boca, luego de contracciones abdominales sin pausa de tiempo, o la presencia de contenido digestivo medido por visualización directa en las bandejas metálicas en promedio cada 8 horas. Este evento fue evaluado 3 veces al día durante 30 minutos (6:00, 12:00 y 18:00 horas). Durante estos momentos se revisaron comportamientos de malestar general o contracciones abdominales, y se realizó un chequeo general de las bandejas metálicas de cada uno de los guacales. Si el vómito se presentaba 30 minutos posteriores a la administración del tratamiento, se procedía con un nuevo suministro del microencapsulado o control, dependiendo del grupo al que el perro estuviera asignado, con el fin de asegurar el mantenimiento óptimo de los niveles séricos de doxiciclina y evitar un descenso por debajo de MIC. Los datos fueron organizados en el programa Excel y analizados por medio del paquete estadístico SPSS versión 22

para Windows versión 11.5. Para el análisis de estos eventos se realizó un estudio de tipo longitudinal y se utilizó el análisis bidimensional de Friedman de varianza por rangos para muestras relacionadas de acuerdo con la frecuencia diaria de revisión.

Desenlace secundario:

Cambios en los parámetros sanguíneos, tanto hematológicos como de química sanguínea comparados con los valores hematológicos considerados normales y entre los dos grupos intervenidos (Schultze et al., 2000; Latimer et al., 2005; Mackin et al., 2000). A los pacientes considerados con CME se les tomó 5 ml de sangre entera con EDTA y en tubo sin anticoagulante. Fueron realizados 6 muestreos de sangre en los tiempos 0, 168, 264, 360, 504 y 672 horas (0, 7, 11, 15, 21 y 28 días respectivamente). Las muestras fueron transportadas de inmediato al Laboratorio de Diagnóstico y Estudios Clínicos de la Corporación Universitaria Lasallista donde se realizó análisis hematológico (Eritrocitos (mill/ μ l), Hemoglobina (g/dl), Hematocrito (%), VCM (fl), HCM (Pg), CHbCM (g/dl), Amplitud de la Distribución Eritrocitaria ADE (%), Metarrubricitos (en 100 leucocitos), Plaquetas ($\times 10^3/\mu$ l), Proteínas plasmáticas (g/l), Leucocitos totales ($/\mu$ l), Basófilos ($/\mu$ l), Eosinófilos ($/\mu$ l), Neutrófilos ($/\mu$ l), Bandas ($/\mu$ l), Linfocitos ($/\mu$ l), Monocitos ($/\mu$ l)), Creatinina (mg/dl) y ALT (U/l)). Para este procedimiento se utilizó un equipo Abacus Junior Vet, Diatron®, y un espectrofotómetro A-15 Biosystems®. Se establecieron las diferencias entre grupos en pacientes con CME en la hora suministrada por diferentes métodos (Prueba T para muestras relacionadas para datos paramétricos; y Mann-Whitney para datos no paramétricas). Un valor de p menor o igual a 0,05 fue considerado significativo. Los resultados fueron analizados con los programas Excel Office 2013 SigmaPlot 12.0, GraphPad Prisma versión 7 y SPSS versión 22.

Desenlace terciario:

Equivalencia en los efectos bacteriostáticos en pacientes con CME definida como el número de copias de DNA del gen 16S rRNA por qPCR detectado por encima del Ct (Threshold cycle) durante 28 días de tratamiento, entre las dos intervenciones, manteniendo concentraciones plasmáticas de doxiciclina en sangre por encima de MIC (0,03 ug/ml) comprobada por UPLC-MS/MS (Mazabel, 2017). Durante este estudio se obtuvieron muestras de sangre (3 ml) mediante venopunción con el anticoagulante EDTA, a las 0, 24, 48,72, 96, 240 (10d), 360 (15d), 480 (20d) y 672 horas (28d) del tiempo de estudio. A cada una de las muestras se les realizó extracción de DNA y amplificación molecular de fragmentos del gen 16S rRNA de la familia Anaplasmataceae por qPCR siguiendo los mismos protocolos utilizados para el reclutamiento de los ejemplares caninos.

Comparación de copias de DNA

Para comparar el número de copias de DNA de amplificación, se realizó ligación de un plásmido con un fragmento del gen 16S rRNA. Inicialmente se realizó un PCR convencional usando el estuche comercial de Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo®) con cebadores EC16S F (5'-TCGCTATTAGATGAGCCTACGT-3') y EC16S R (5'-GAGTCTGGACCGTATCTCAGT-3') (Cabrera, 2018; Peleg et al., 2010; Trevor Waner et al., 2014). El volumen de reacción final fue de 20µl en el que se utilizaron (11,7 µl) agua ultra pura, 10x taq Buffer (4 µl), DMSO 3% (5 µl), dNTPs mix 10 mM (0,5 µl), cada cebador 10 mM (0,5 µl), Phusion Green Hot Start II DNA Polimerase (0,2 µl), y DNA problema (2 µl). Las condiciones en el termociclador fueron de 98°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 98°C por 15

segundos, 66°C por 30 segundos y 72°C por 20 segundos, y una extensión final de 72°C por 5 minutos. El producto obtenido en esta reacción se clonó en el plásmido pGEM®-T Easy Vector (Promega®) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Se realizó la transfección usando buffer de ligación (5 µl), un vector pGEM®-T Easy Vector (50 ng) (1 µl), T4 DNA Ligasa (1 µl) y el producto obtenido por PCR (3 µl). Esta reacción se mantuvo a 4°C durante 16 horas. Para la transformación se utilizaron células XL1-Blue (1×10^8 cfu/µg DNA) quimiocompetentes, a las que se les añadió a la reacción de ligación. Fue llevado a estrés térmico por un tiempo de 45 minutos en hielo y posteriormente a una temperatura de 42°C por 45 segundos; y de nuevo a hielo por 2 minutos. A esta reacción se le añadió un medio SOC (900 µl) el cual fue incubado con agitación constante durante 45 minutos a 37°C; y posteriormente incubados durante 16 horas en agar LB con ampicilina (100µg/mL) y el buffer IPTG/X-Gal. Fueron escogidas un número de 5 colonias de color blanco, las cuales se incubaron en caldo LB con ampicilina, estas se dejaron incubando durante 24 horas. Un mililitro de este medio fue centrifugado y al pellet obtenido se le realizó extracción del plásmido de las células transformadas, a las cuales se les sometió a lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). A la extracción se le realizó electroforesis con gel de agarosa al 1% y se utilizó marcador de peso molecular DNA Lambda/HindIII (Promega). Luego de certificar la presencia de un plásmido de 3139 pb se procedió a purificar las extracciones con un estuche comercial de purificación (Promega®), y se determinó la presencia de DNA por medio de un gel de agarosa al 0.8% (Figura 8). Se realizó una dilución de la purificación en 1:20 del DNA plasmídico en agua calidad PCR, esta dilución se cuantificó por medio del reactivo Qubitds DNA HS Assay estuche comercial de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific®), y por medio de un fluorómetro Qubit 2.0 el cual se calibró con estándares. Para este procedimiento se siguieron los protocolos del fabricante.

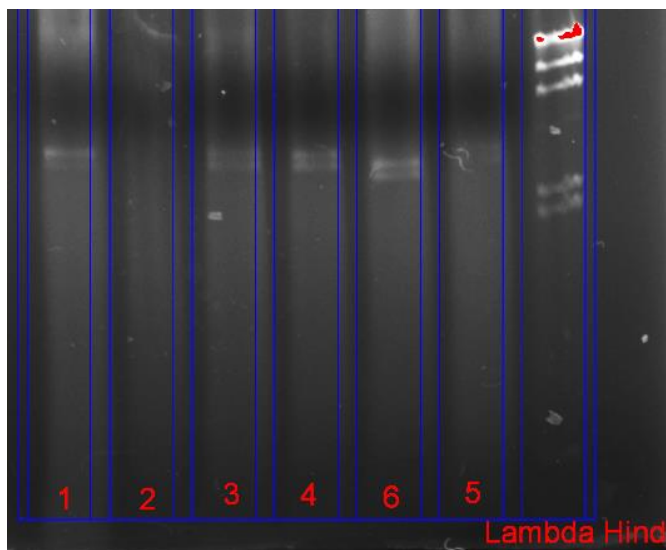


Figura 8. Plásmido de 3139 pb, con ligación de un fragmento del gen 16S rRNA (colonias número 1, 3 y 4). Pozo número 6 plásmido sin transformar. Pozo 2 control negativo. Pozo 5 sin amplificación. *MPM Lambda Hind*.

Estrategias de adherencia y exclusión de ejemplares durante el estudio

La estrategia de adherencia de esta investigación fue el tratamiento de la totalidad de animales diagnosticados con CME, inclusive si no hicieron parte del estudio. También se les realizó desparasitación completa, y posterior al estudio esterilización de los individuos reclutados. Durante las intervenciones se realizó un seguimiento fluido por medio de llamadas telefónicas con mensajes por celular y correo electrónico, con el fin de motivar a los dueños de los albergues a que los pacientes permanecieran dentro del ensayo preclínico. Los animales a los que les fuera detectados efectos adversos considerados como graves, relacionados con el tratamiento con doxiciclina, o por la presencia de CME, o que carecieran de niveles de doxiciclina por encima de MIC, debían ser excluidos durante este estudio, con el fin de recibir un tratamiento comercial validado.

Resultados

Muestras de sangre de 198 ejemplares caninos, fueron recolectadas en los dos albergues anteriormente descritos. Al momento de la toma de muestra de sangre, las constantes como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, pulso femoral, temperatura corporal, porcentaje de hidratación, color de mucosas y tiempo de llenado capilar, oscilaron dentro de los rangos estables para la especie y características fisiológicas. A la totalidad de los ejemplares de los albergues muestreados se les realizó un chequeo médico básico. Muy pocos perros contaron con historias clínicas, por lo que se tuvo en cuenta el criterio de los dueños de los albergues con el fin de determinar antecedentes (tratamientos con antibióticos de la familia de las tetraciclinas en el último mes antes del estudio, registro de eventos de hipersensibilidad a antibióticos, cambios evidentes y repetidos en las constantes fisiológicas reportados al chequeo médico veterinario en los últimos meses y edad estimada).

Reclutamiento: Análisis molecular

De 198 ejemplares caninos que fueron muestreados y evaluados por qPCR, 5 resultaron positivos a la amplificación por medio de los cebadores EC16S (3 de “El Albergue Municipal de Caldas”, y 2 ejemplares del albergue “El Hogar de Alicia”). Luego de realizar los ensayos moleculares con los protocolos descritos por tiempo real, se realizó PCR para la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA y dsb para PCR convencional, y se observaron bandas de 421 pb para el gen 16s rRNA (Figura 9) y 684 pb para el gen dsb (Figura 10).

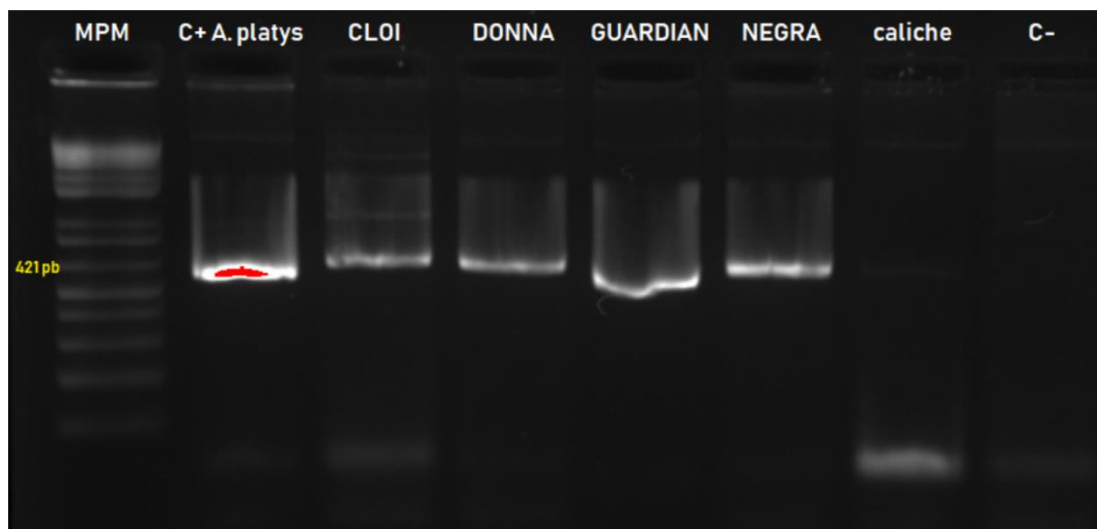


Figura 9. Amplicones de PCR para el cebador 16S rRNA, los cuales habían salido positivos para el marcador EC16S por qPCR. Control positivo: *Anaplasma platys*. Control negativo externo (NEG). MPM (Marcador de peso molecular GenRuler 100 bp Plus).

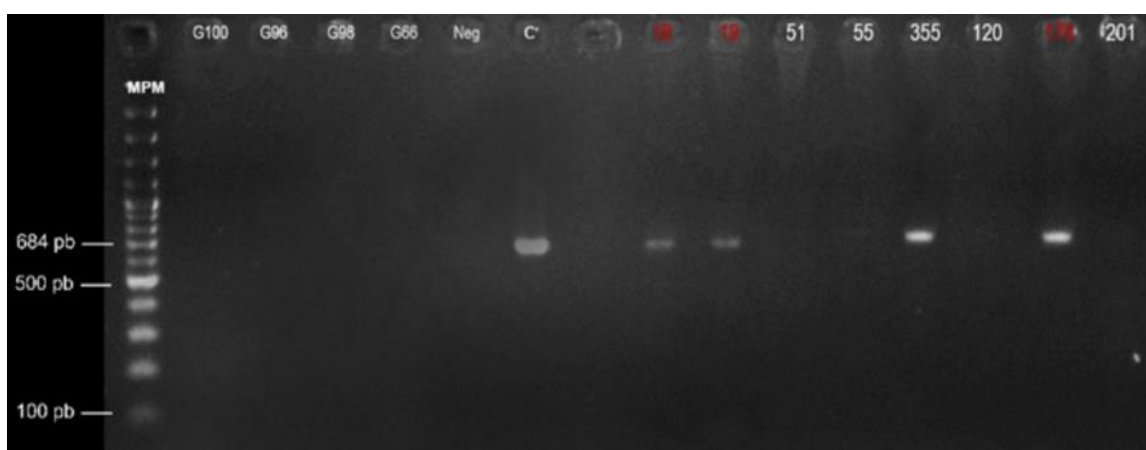


Figura 10. Amplicones de PCR para el cebador Dsb, los cuales habían salido positivos para el marcador EC16S por qPCR (Rojo: 18, 19, 176. Blanco 355). Control positivo: *Anaplasma marginale*. Control negativo externo (NEG). MPM (Marcador de peso molecular GenRuler 100 bp Plus) (Cabrera, 2018).

En los 5 ejemplares muestreados considerados positivos para *Ehrlichia canis* por qPCR y PCR para el gen 16S rRNA y Dsb, no se detectaron coinfecciones con *Anaplasma platys* y hemoprotozoarios caninos (*Babesia* spp y *Hepatozoon* spp) (datos no mostrados).

Análisis filogenético

Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados y comparados con secuencias publicadas en el GenBank, dando un 100% de identidad con *Ehrlichia canis* con los iniciadores 16S rRNA (Figura 11) y Dsb (Figura 12). Adicionalmente se hizo un análisis filogenético usando una secuencia consenso de los productos de la PCR confirmando la identidad de estas secuencias.

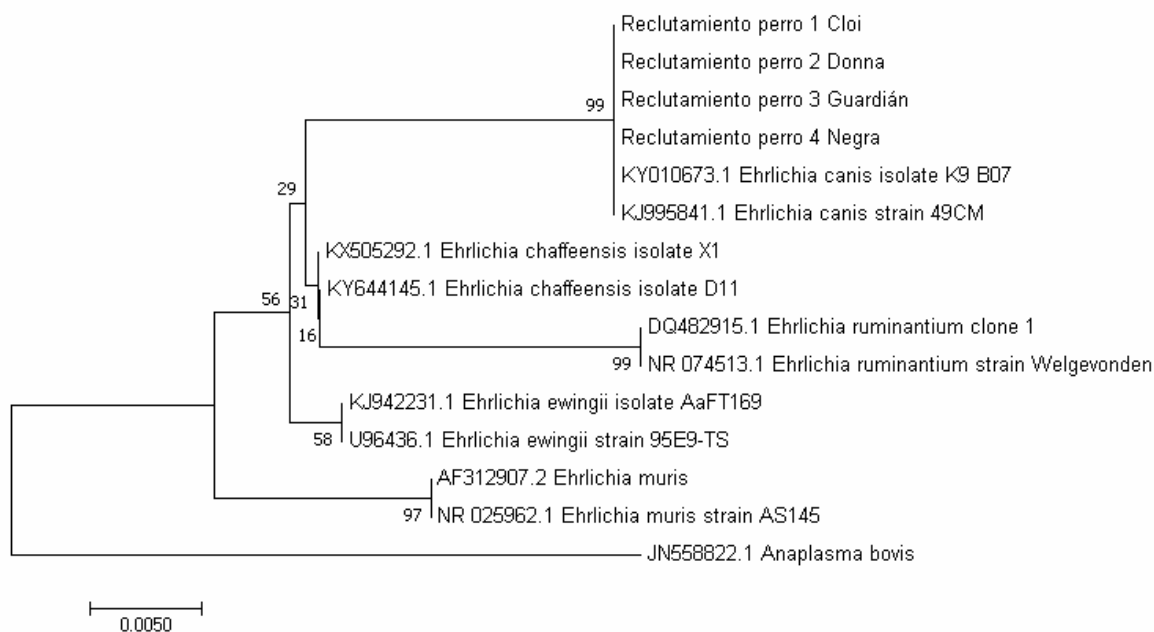


Figura 11. Árbol filogenético realizado por el método Neighbor-Joining con el gen 16S rRNA específico de la familia Anaplasmataceae. Se usó un bootstrap de 1000 réplicas y el método de la distancia de P para el cálculo de la distancia evolutiva. El análisis fue realizado en el programa MEGA 7 y el árbol está enraizado con el microorganismo *Anaplasma bovis*.

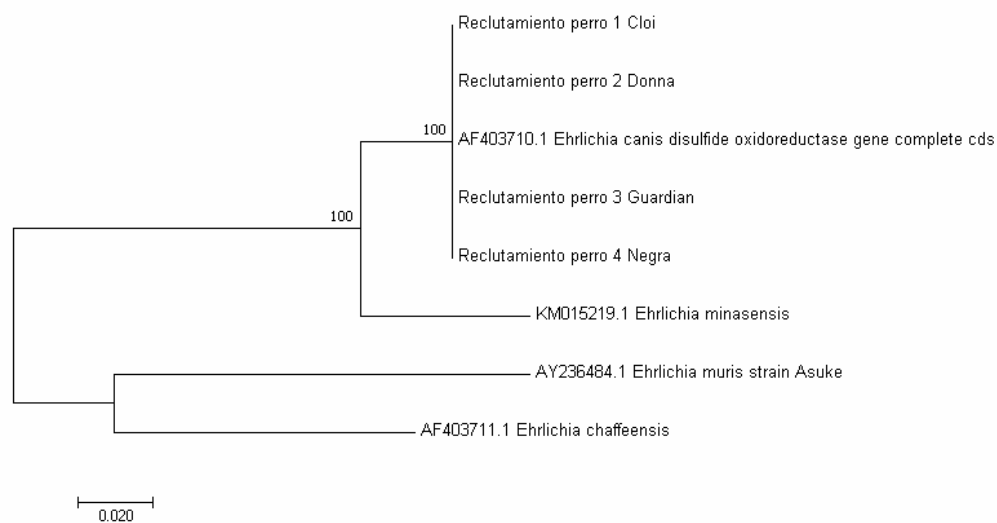


Figura 32. Árbol filogenético realizado por el método Neighbor-Joining con el gen Dsb de Ehrlichia. Se usó un bootstrap de 1000 réplicas y el método de la distancia de P para el cálculo de la distancia evolutiva. El análisis fue realizado en el programa MEGA 7. Árbol enraizado en el punto medio.

Ensayo preclínico de seguridad

De la totalidad de animales muestreados, 5 ejemplares cumplieron con los criterios de inclusión, de este grupo fueron reclutados cuatro individuos por el diseño escogido para el estudio (Tabla 9). Un ejemplar que no fue tenido en cuenta en el estudio, que cumplió con los criterios de inclusión y careció de criterios de exclusión, fue tratado bajo las mismas condiciones que los demás caninos participantes.

Tabla 9

Ensayo preclínico: características basales de los caninos tratados durante 28 días. N=4 (100%).

Características basales n=4 (%)(SD)			
Peso promedio		Kg	21 (3,560)
Edad aproximada en promedio		Años	5,75 (3,775)
Raza		Mestizo	4 (100)
Ausencia de <i>Anaplasma spp</i>, <i>Babesia spp</i> y <i>Hepatozoon spp</i>		Negativos	4 (100)
Detección molecular de DNA de <i>Ehrlichia canis</i>		Positivos	4 (100)
Anormalidades (Frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, fiebre) al chequeo médico, eventos vómito, diarrea en los últimos 7 días		Ausentes	4 (100)
Valores hematológicos y de referencia		Tratam.	Media 2 (50) c/grupo
Eritrocitos (mill/μl)	5,60 - 8,50	Formicrodox	5,595 \pm 1,209
		Control	5,06 \pm 3,648
Hemoglobina (g/dl)	12 - 19	Formicrodox	11,75 \pm 2,899
		Control	10,45 \pm 7,848
Hematocrito (%)	37 - 56	Formicrodox	36,6 \pm 8,202
		Control	34 \pm 24,324
VCM (fI)	65 - 77	Formicrodox	65,5 \pm 0,707
		Control	67,5 \pm 0,707
HCM (Pg)	21 - 26,2	Formicrodox	20,9 \pm 0,565
		Control	20,45 \pm 0,777
CHbCM (g/dl)	32 - 37	Formicrodox	31,95 \pm 0,636
		Control	30,3 \pm 1,414
Amplitud de la Distribución Eritrocitaria (%)	12 - 18	Formicrodox	15,6 \pm 1,272
		Control	17,25 \pm 2,757
Plaquetas ($\times 10^3/\mu$l)	200 - 500	Formicrodox	64 \pm 11,313
		Control	84,5 \pm 26,162
Proteínas plasmáticas (g/l)	50 - 80	Formicrodox	85 \pm 7,071
		Control	84 \pm 2,828
Leucocitos totales ($/\mu$l)	5000 - 14100	Formicrodox	6868,5 \pm 1091,065
		Control	6243 \pm 3997,981
Eosinófilos ($/\mu$l)	100 - 1900	Formicrodox	739,5 \pm 505,581
		Control	227 \pm 321,026
Neutrófilos ($/\mu$l)	3300 - 10000	Formicrodox	4418,5 \pm 557,907
		Control	4581 \pm 2371,636
Linfocitos ($/\mu$l)	500 - 4500	Formicrodox	1008 \pm 735,391
		Control	970 \pm 937,623
Monocitos ($/\mu$l)	100 - 1300	Formicrodox	611 \pm 432,749
		Control	465,5 \pm 368,402
ALT (U/l)	21 - 102	Formicrodox	29,5 \pm 3,535
		Control	59 \pm 11,313
Creatinina (mg/dl)	0,5 - 1,5	Formicrodox	1,1 \pm 0,141
		Control	0,95 \pm 0,070

*Datos de referencia para la especie canina (Schultze et al., 2000; Latimer et al., 2005). Test de normalidad Shapiro-Wilk. Diferencia entre tratamientos: Prueba de muestras emparejadas, significancia bilateral; Prueba T para muestras relacionadas.

Desenlace primario: Eventos de vómito durante el tratamiento.

De los 4 ejemplares escogidos para el estudio y aleatorizados en cada grupo de tratamiento, el evento vómito (expulsión de contenido gástrico por la boca, luego de contracciones abdominales sin pausa de tiempo) fue analizado. En el grupo control, el evento se dio en un animal en 3 ocasiones (a los dos primeros días de intervención). Para el grupo Formicrodox, los dos ejemplares presentaron el evento. Uno de ellos (en un par de ocasiones) presentó vómito finalizando la primera semana de tratamiento (un evento el día 7 y otro el día 8), y el otro ejemplar perteneciente al grupo del microencapsulado tuvo un evento en el día número 4. Solo uno de los ejemplares no presentó eventos durante los 28 días de tratamiento y correspondió a un perro que hizo parte del grupo control (Figura 5). En total por cada grupo se presentaron 3 eventos vómito durante los 28 días de tratamiento, tanto en el grupo Formicrodox como para el grupo Control ($p=1.0$).

Desenlace secundario. Cambios en parámetros sanguíneos.

Se tomaron 6 muestras por paciente durante el estudio, y fueron analizados los cambios en los valores hematológicos en el transcurso de 28 días de tratamiento.

Se compararon valores obtenidos teniendo en cuenta los datos de referencia publicados para la especie. Se determinó el valor de significancia entre grupos antes y después de los tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10

Valores hematológicos durante el estudio preclínico.

	Dato de referencia para la especie	Tratamiento	Tiempo 0	p1 (t0)	Día 6	Día 11	Día 17	Día 22	Día 28	p2 (d28)
Eritrocitos (mill/ μ l)	5,60 - 8,50	Formicrodox	5,595 \pm 1,209	0,790	5,815 \pm 0,601	6,105 \pm 0,120	6,765 \pm 0,007	6,15 \pm 0,226	6,995 \pm 0,092	0,822
		Control	5,06 \pm 3,648		5,465 \pm 3,203	5,57 \pm 2,390	6,115 \pm 2,170	5,815 \pm 1,746	6,545 \pm 0,884	
Hemoglobina (g/dl)	12 - 19	Formicrodox	11,75 \pm 2,899	0,772	12,4 \pm 1,697	13,4 \pm 0,565	14,5 \pm 0,565	13,25 \pm 0,777	15,15 \pm 0,070	0,772
		Control	10,45 \pm 7,848		11,9 \pm 6,646	12,2 \pm 5,515	12,95 \pm 4,737	12,5 \pm 4,384	13,85 \pm 2,333	
Hematocrito (%)	37 - 56	Formicrodox	36,6 \pm 8,202	0,847	38,65 \pm 4,737	40,3 \pm 1,131	44,35 \pm 0,636	40,55 \pm 2,616	46 \pm 1,838	0,824
		Control	34 \pm 24,324		37 \pm 20,081	37,95 \pm 15,202	40,65 \pm 14,778	38,25 \pm 12,940	43 \pm 8,061	
VCM (fI)	65 - 77	Formicrodox	65,5 \pm 0,707	0,301	66,5 \pm 0,707	66,5 \pm 0,707	65,5 \pm 0,707	66 \pm 1,414	66 \pm 1,414	0,792
		Control	67,5 \pm 0,707		68,5 \pm 3,535	68,5 \pm 2,121	66,5 \pm 0,707	65,5 \pm 2,121	65,5 \pm 3,535	
HCM (Pg)	21 - 26,2	Formicrodox	20,9 \pm 0,565	0,531	21,3 \pm 0,707	21,9 \pm 0,565	21,4 \pm 0,848	21,5 \pm 0,565	21,65 \pm 0,070	0,446
		Control	20,45 \pm 0,777		21,9 \pm 0,707	21,25 \pm 0,212	21,15 \pm 0,353	21,35 \pm 1,202	21,1 \pm 0,848	
CHbCM (g/dl)	32 - 37	Formicrodox	31,95 \pm 0,636	0,086	32,05 \pm 0,494	33,1 \pm 0,565	32,65 \pm 0,919	32,55 \pm 0,070	32,9 \pm 0,989	0,435
		Control	30,3 \pm 1,414		31,75 \pm 0,636	31,75 \pm 1,767	31,8 \pm 0,282	32,55 \pm 0,494	32,2 \pm 0,424	
ADE (%)	12 - 18	Formicrodox	15,6 \pm 1,272	0,474	16,1 \pm 1,414	15,7 \pm 1,131	15,95 \pm 0,919	15,9 \pm 0,424	16,2 \pm 0,565	0,732
		Control	17,25 \pm 2,757		18 \pm 3,818	17,3 \pm 2,828	16,75 \pm 1,909	16,85 \pm 1,767	16,95 \pm 1,626	
Plaquetas ($\times 10^9/\mu$ l)	200 - 500	Formicrodox	64 \pm 11,313	0,865	222 \pm 19,798	210 \pm 8,485	207,5 \pm 14,849	191 \pm 73,539	220,5 \pm 4,949	0,470
		Control	84,5 \pm 26,162		164 \pm 100,409	168 \pm 140,007	220,5 \pm 246,780	249,5 \pm 122,329	311,5 \pm 190,211	
Proteínas plasmáticas (g/l)	50 - 80	Formicrodox	85 \pm 7,071	0,856	84 \pm 5,656	82 \pm 5,656	80 \pm 8,485	75 \pm 7,071	79 \pm 1,414	0,720
		Control	84 \pm 2,828		87 \pm 4,242	87 \pm 4,242	86 \pm 2,828	80 \pm 2,828	80 \pm 1,414	
Leucocitos totales (μ l)	5000 - 14100	Formicrodox	6868,5 \pm 1091,065	0,837	12570 \pm 2291,025	12585 \pm 5140,666	15480 \pm 4228,498	11290 \pm 3082,985	9250 \pm 1682,914	0,182
		Control	6243 \pm 3997,981		8823,5 \pm 2370,929	8630 \pm 2630,437	5735 \pm 2184,959	6700 \pm 2729,432	4935 \pm 615,182	
Eosinófilos (μ l)	100 - 1900	Formicrodox	739,5 \pm 505,581	0,782	1034,5 \pm 860,548	1460 \pm 1606,546	2712,5 \pm 3052,579	3419 \pm 3546,847	2683 \pm 2996,718	0,304
		Control	227 \pm 321,026		229 \pm 121,622	487 \pm 497,803	453 \pm 285,671	506,5 \pm 228,395	620,5 \pm 649,831	
Neutrófilos (μ l)	3300 - 10000	Formicrodox	4418,5 \pm 557,907	0,958	8405,5 \pm 1356,937	8770,5 \pm 5947,475	9174,5 \pm 6616,398	5748 \pm 889,540	4249,5 \pm 1284,813	0,692
		Control	4581 \pm 2371,636		7113,5 \pm 1670,893	5723 \pm 1104,500	3917,5 \pm 740,340	4457 \pm 2728,017	3028 \pm 654,780	
Linfocitos (μ l)	500 - 4500	Formicrodox	1008 \pm 735,391	0,972	2141 \pm 1788,980	2313 \pm 2005,354	2786,5 \pm 761,554	1402,5 \pm 78,488	1525 \pm 237,587	0,521
		Control	970 \pm 937,623		615,5 \pm 465,983	1837,5 \pm 1257,942	869,5 \pm 932,673	1330 \pm 193,747	806,5 \pm 758,725	
Monocitos (μ l)	100 - 1300	Formicrodox	611 \pm 432,749	0,605	754 \pm 137,178	629,5 \pm 256,679	619,5 \pm 168,998	519 \pm 219,203	374,5 \pm 382,544	0,705
		Control	465,5 \pm 368,402		651 \pm 415,778	481 \pm 86,267	495 \pm 226,274	407 \pm 35,355	480,5 \pm 147,785	

ALT (U/l)	21 - 102	Formicrodox	29,5 ± 3,535	0,328	40,5 ± 19,091	69 ± 43,840	76 ± 57,982	57,5 ± 34,648	48 ± 28,284	0,929
		Control	59 ± 11,313		58 ± 8,485	63,5 ± 10,606	68 ± 16,970	56,5 ± 2,121	50,5 ± 2,121	
Creatinina (mg/dl)	0,5 - 1,5	Formicrodox	1,1 ± 0,141	0,306	1,05 ± 0,212	1,1 ± 0,141	1,1 ± 0,141	1,1 ± 0,141	1,25 ± 0,070	0,306
		Control	0,95 ± 0,070		0,9 ± 0	0,8 ± 0,141	1,05 ± 0,070	1,1 ± 0,141	1,1 ± 0,141	

*Características basales y posteriores a las intervenciones. N=4 (100%). Diferencia entre tratamientos: Prueba de muestras emparejadas, significancia bilateral; Prueba T para muestras relacionadas. (Rojo: Resultados obtenidos por debajo del valor de referencia para la especie. Azul: Resultado obtenidos por encima del valor de referencia para la especie).

En el tiempo 0, los datos inferiores obtenidos por debajo del límite de referencia, fueron similares tanto en el grupo Formicrodox como en el grupo Control, para los indicadores Eritrocitos, Hemoglobina, Hematocrito, HCM, CHCM y plaquetas. Los datos superiores a los valores de referencia se dieron de manera homogénea en los dos grupos en el ítem Proteínas plasmáticas. Todos los datos hematológicos para el día 28 de tratamiento se encontraron en los rangos considerados normales para la especie. Los valores hematológicos plaquetas y HCM para el grupo control se reestablecieron a valores normales luego del día 11 y 17 respectivamente. El valor del indicador proteínas plasmáticas fue el único que se encontró desde el inicio del estudio (tiempo 0) por encima de los valores reportados como normales, y se reestablecieron en rangos fisiológicos después de 11 días para el grupo al que se le administró el microencapsulado, y 17 días para el grupo Control. En uno de los ejemplares se evidenció un aumento de los eosinófilos en los últimos 10 días de tratamiento, y debido al bajo número de perros reclutados por grupo, se observó un dato promedio para la intervención Formicrodox superior respecto a los valores de referencia. Los resultados de los indicadores hematológicos basófilos, neutrófilos banda y metarrubricitos fueron excluidos del análisis porque presentaron datos esporádicos que no permitieron analizar los

misimos. Los valores de química sanguínea no cambiaron durante el estudio a valores anormales en ningún momento. No se dio una diferencia estadística durante el estudio entre los valores hematológicos al comparar los tratamientos (Tabla 11).

Tabla 11

Significancia estadística de valores hematológicos durante el estudio.

	Test de normalidad (Shapiro-Wilk)	Diferencia entre tratamientos (Student-Newman-Keuls Method)	Interacción entre tratamiento y tiempo	Diferencia entre tiempo 0 y día 28 de tratamiento
Eritrocitos (mill/ μ l)	0,881	0,803	0,999	0,176
Hemoglobina (g/dl)	0,896	0,799	0,996	0,084
Hematocrito (%)	0,901	0,842	0,999	0,118
VCM (fI)	0,083	0,272	0,824	0,941
HCM (Pg)	0,958	0,652	0,660	0,225
CHbCM (g/dl)	0,777	0,263	0,638	0,157
ADE (%)	0,958	0,564	0,718	0,945
Plaquetas ($\times 10^3$ / μ l)	0,128	0,901	0,457	0,022*
Proteínas plasmáticas (g/l)	0,237	0,551	0,184	0,03*
Leucocitos totales (/math>\mul)	0,565	0,148	0,277	0,760
Eosinófilos (/math>\mul)	0,913	0,396	0,458	0,455
Neutrófilos (/math>\mul)	0,999	0,469	0,533	0,562
Linfocitos (/math>\mul)	0,830	0,451	0,261	0,697
Monocitos (/math>\mul)	0,701	0,651	0,968	0,787

ALT (U/l)	0,772	0,817	0,509	0,655
Creatinina (mg/dl)	0,058	0,333	0,246	0,103

* Test de normalidad Shapiro-Wilk. Diferencia entre tratamientos: Prueba de muestras emparejadas, significancia bilateral; Prueba T para muestras relacionadas.

Luego de comparar la diferencia entre tratamientos, la interacción entre el tratamiento y los tiempos de estudio, y el valor inicial y final de los parámetros hematológicos obtenidos; se determinó una diferencia estadística entre el valor inicial de plaquetas y proteínas plasmáticas en comparación con el valor final para estos indicadores hematológicos en el día 28 de tratamiento.

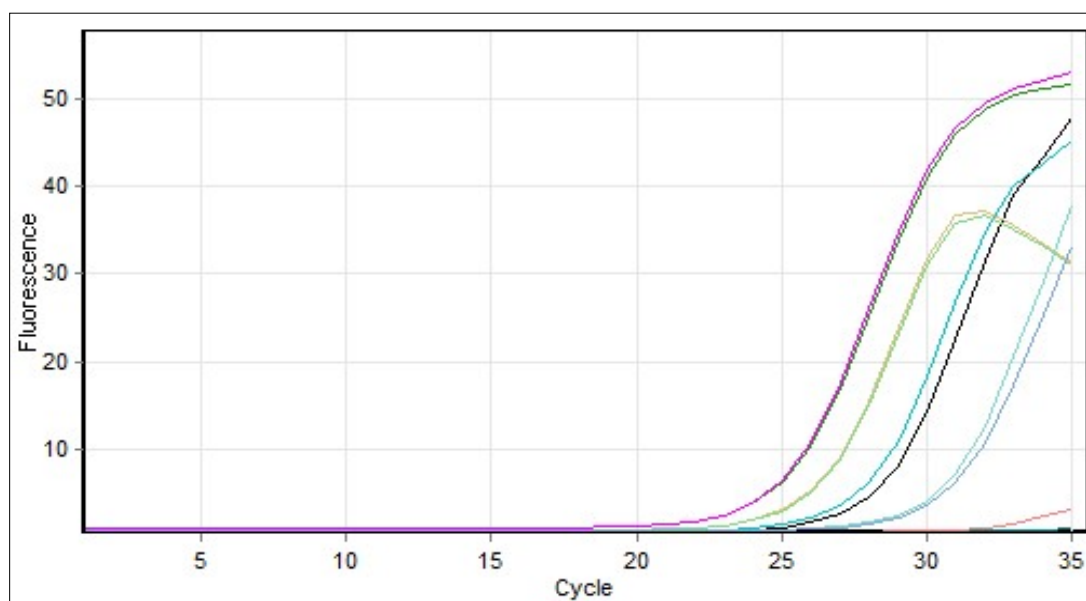
Desenlace terciario. Equivalencia de efectos bacteriostáticos

Luego del reclutamiento, la aleatorización y toma de muestras, se realizó la detección de copias de DNA por medio de la amplificación molecular de fragmentos del gen 16S rRNA de la familia Anaplasmataceae por qPCR. Se realizó un primer ensayo de amplificación del gen, en los tiempos 0, 48, 96, 240 (10d), 360 (15d), 480 (20d) y 672 horas (28d). Sin embargo, en este qPCR solo se pudo determinar amplificación en el día 0 con detección de DNA del género *Ehrlichia* spp. cercano a la línea Ct para la hora 48 (datos no mostrados); por lo tanto, se repitió el proceso teniendo en cuenta solo los tiempos 0, 24 y 48 horas de los ejemplares reclutados. En este segundo proceso se pudo demostrar la disminución progresiva en la amplificación de DNA del gen 16S rRNA de *Ehrlichia canis* durante los dos primeros días (datos no mostrados). Los perfiles obtenidos en este protocolo permitieron diferenciar las especies *Anaplasma* spp y *Ehrlichia* spp. Los análisis de curvas de disociación mostraron curvas de amplificación específicas (Para el género

Anaplasmaspp: $T_m = 84^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$; para el género *Ehrlichia spp* $T_m = 83^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$) y ausencia de amplificación no específica.

Desarrollo de las condiciones óptimas por qPCR

Los productos de PCR se formaron después del ciclo 20. Se obtuvieron amplificaciones de fragmentos del gen 16S rRNA con el uso de cebadores EC16SF y EC16SR (Peleg et al., 2010). Los ensayos realizados no fueron del todo satisfactorios ya que solo se pudieron detectar cuatro estándares del plásmido clonado ($1,25 \times 10^7$, $1,25 \times 10^6$, $1,25 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^4$ copias) (Figuras 13, 14 y 15).



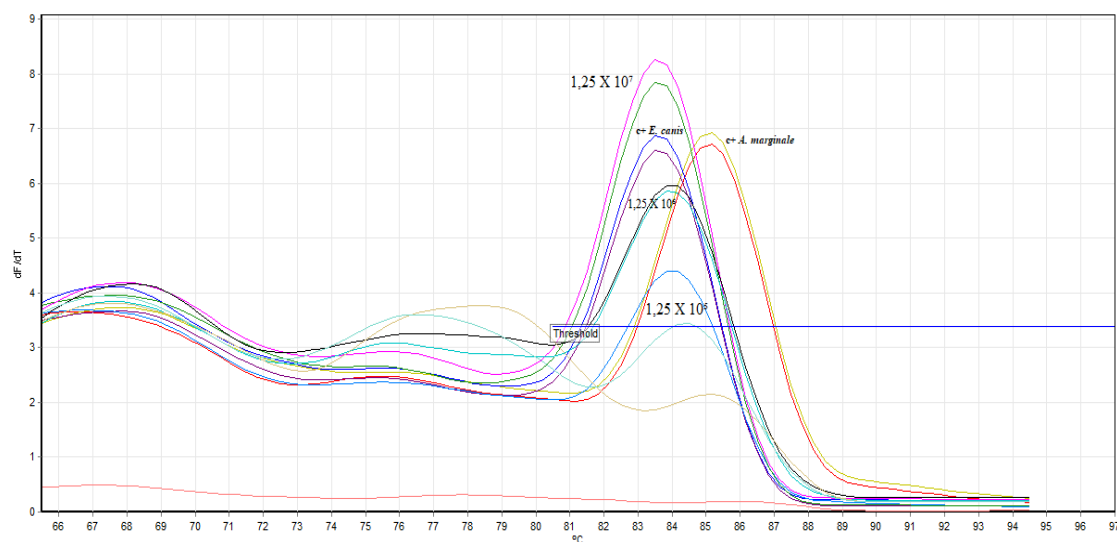


Figura 43 y Figura 54. Curvas de calibración estándar y de disociación por qPCR para Ehrlichia con el plásmido pGEM®-T Easy Vector (Promega®) que contiene los amplicones obtenidos con los cebadores EC16SF y EC16SR clonado (Peleg et al., 2010), el cual corresponde a un fragmento del gen 16S rRNA de la familia Anaplasmataceae.

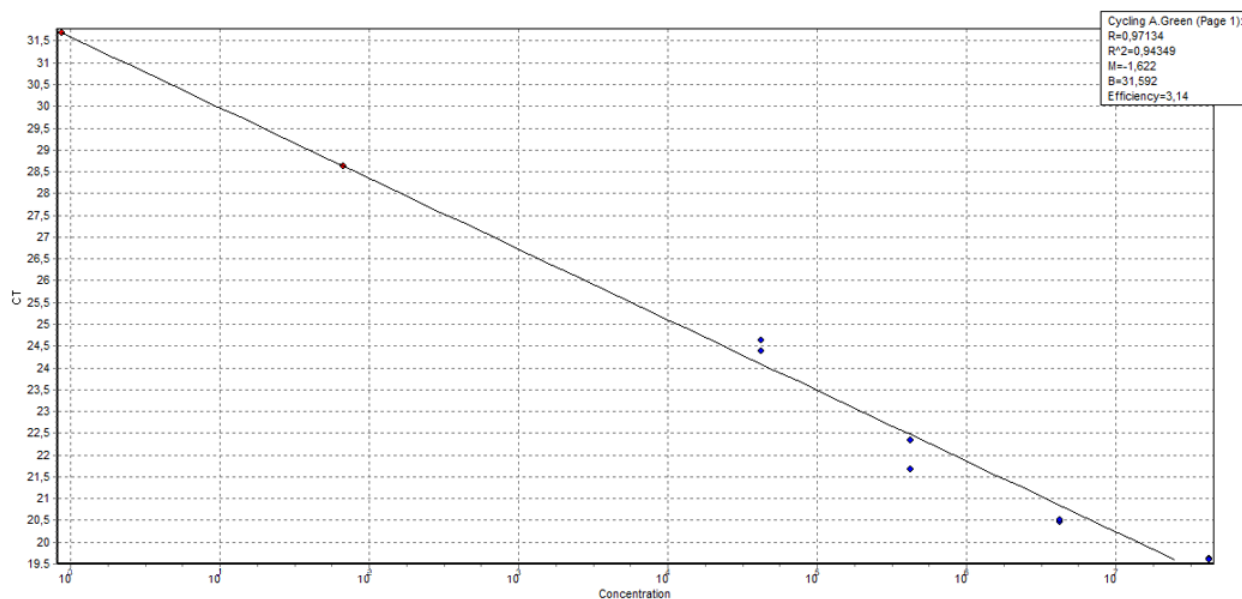


Figura 65. Curva de calibración estándar con el plásmido pGEM®-T Easy Vector (Promega®) que contiene un fragmento del gen 16S rRNA, obtenidos con los cebadores EC16SF y EC16SR (Peleg et al., 2010).

La amplificación de las diluciones seriadas del plásmido estándar exhibió linealidad dentro del rango de $1,25 \times 10^7$ a $1,25 \times 10^4$ copias por muestra. El coeficiente de correlación para las curvas estándar de plásmidos clonados fue de 0,97, y una eficiencia (pendiente de la recta) de 3,14.

Se amplificaron muestras de los ejemplares caninos durante los primeros 2 días de tratamiento. De igual manera entre las 72 a 96 horas de la intervención, fue observada amplificación, sin embargo, se generó ruido en el análisis (Melt y HRM) lo que no permitió determinar un resultado confiable en el tercero y cuarto día de tratamiento.

En la totalidad de las muestras analizadas desde el día 10 hasta el último día de tratamiento del ensayo clínico (día 28) los valores de Ct fueron considerados insignificantes (valores similares a los controles negativos) (Tabla 12) (Figura 16).

Tabla 12

Valores del número de copias calculadas de DNA por ml de sangre.

Tiempo/días	Control		Formicrodox		p
	Media	Dest	Media	Dest	
0	2,04E+07 (n=6)	2,55E+06	1,06E+08 (n=6)	1,39E+07	0,18
1	2,20E+07 (n=5)	1,25E+06	1,24E+08 (n=3)	7,02E+06	0,48
2	1,86E+07 (n=4)	1,34E+06	8,30E+07 (n=5)	1,74E+07	0,004*
3**	1,45E+07 (n=1)	-	4,95E+07 (n=4)	4,34E+07	-
Test de normalidad	0,16		0,614		

* Test de normalidad Shapiro-Wilk. Prueba T para muestras independientes. ** Se incluyen resultados obtenidos en el tercer día de tratamiento, sin embargo para el grupo control solo se pudo obtener un dato.

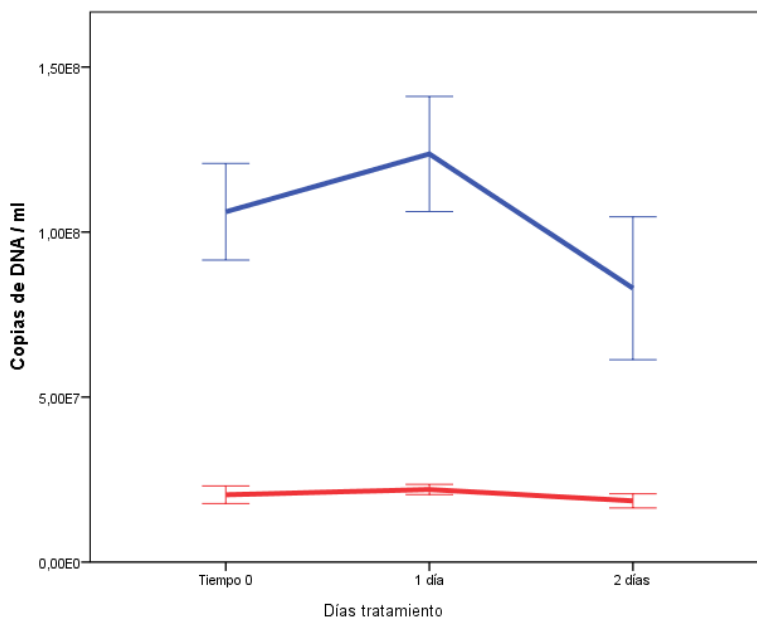


Figura 16. Cinética de copias de DNA de *Ehrlichia canis* (16S rRNA) por qPCR en sangre de perros tratados (Azul: Formicrodox, Rojo: control) durante los primeros 3 días de tratamiento.

Discusión

En este estudio fue evaluada la seguridad una formulación microestructurada de doxiciclina hiclato con un recubrimiento de carboximetil celulosa (CMC), sacarosa y gelatina; realizado en el biomodelo canino con CME. En el primer proceso se reclutaron los ejemplares que cumplieron con los criterios de inclusión, y posteriormente se realizó un estudio clínico longitudinal en caninos infectados naturalmente con *Ehrlichia canis*, en el cual se evaluó la seguridad durante un tratamiento oral a una dosis de 10 mg/Kg durante 28 días comparándola con un control (Doxiciclina Hiclato Comercial). Los desenlaces que se tuvieron en cuenta fueron la presencia de eventos de vómito, los cambios en los parámetros hematológicos y la inferencia en la actividad bacteriostática.

Reclutamiento

Se llevó a cabo un estudio transversal de prevalencia en dos albergues caninos del municipio de Caldas Antioquia. 5 ejemplares (2,5%) cumplieron con los criterios de inclusión y 193 perros resultaron negativos por PCR y qPCR para *Ehrlichia canis*. No se presentaron perros con diagnóstico para *Anaplasma* spp y *Babesia* spp. ni coinfecciones para los ejemplares diagnosticados con CME. Las secuencias obtenidas para el gen dsb mostraron una identidad del 100% con especies brasileñas identificadas como *Ehrlichia canis* Sao Paulo (DQ460715) y Jaboticabal (DQ460716). Debido a que el estudio tuvo un diseño de tipo paralelo, fueron reclutados 4 ejemplares caninos para medir los desenlaces. El quinto animal (excluido del estudio) fue tratado con doxiciclina hiclato comercial con el mismo protocolo para el tratamiento de la CME (10 mg/Kg al día por 28 días) como mecanismo de adherencia.

Desenlace primario

Los hallazgos del presente estudio indicaron que la terapia con doxiciclina podría estar relacionada con los efectos secundarios gastrointestinales tanto para el grupo de intervención como para el grupo control. Cada grupo tuvo en total, un número de 3 eventos vómito, durante los 28 días de tratamiento. A pesar de esto, no existieron diferencias significativas entre los dos grupos. El número de eventos presentados durante el tratamiento confirmó que el vómito fue el principal efecto adverso luego del uso de este antibiótico por vía oral. Este resultado fue similar a lo reportado por Shultz y colaboradores quienes documentaron, por medio de un análisis retrospectivo los efectos secundarios más comunes luego del tratamiento con doxiciclina hiclato, y el vómito en este reporte fue el principal evento presente en el 18,3% de los perros analizados

(63/344). Shultz y colaboradores determinaron una asociación entre la presencia de este evento indeseable con una mayor edad del paciente canino. En el presente estudio el animal más viejo presentó, en comparación con los demás perros reclutados, un mayor número de eventos vómito (3 eventos/28 días) (Schulz, Hupfauer, Ammer, Sauter-Louis, & Hartmann, 2011). En ninguno de los 28 días de tratamiento, y en los 6 eventos reportados durante el estudio, el vómito se presentó inmediatamente después de la administración del microencapsulado o del control. El evento vómito en el 83.3% de los casos (5/6) se dio al amanecer o antes del mediodía. De igual manera en 5/6 casos se presentó el evento en la primera semana de intervención. Es posible que se haya dado un grado de irritación en la mucosa gástrica durante los primeros días del estudio en 3 de los 4 ejemplares caninos tratados.

En un estudio realizado por Gallego y colaboradores, se determinó que las micropartículas utilizadas en el presente estudio, se caracterizaron por contar con una superficie lisa y sin grietas, lo cual pudo generar una mayor protección del activo en el medio. El uso de CMC ha sido reportado como un biopolímero, que usado como material de pared, proporciona protección a las micropartículas contra la condición de digestión ácida gástrica y controla la liberación del agente del núcleo en modelos simulados (Calvo, Lozano, Espinosa-Mansilla, & González-Gómez, 2012). Gallego y colaboradores demostraron que Formicrodox cuenta con propiedades de liberación controlada, de la doxiciclina encapsulada, en medios ácidos, por lo tanto, la cantidad del antibiótico que llega a intestino para ser absorbida, podría ser mayor. Esto puede reducir la exposición de la mucosa gástrica al fármaco, disminuyendo dolencias asociadas a la administración de este bacteriostático (Gallego-Londoño, 2017). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, si se compara con datos reportados de eventos indeseables luego de la administración de doxiciclina en el biomodelo canino (Villaescusa et al., 2015).

Desenlace secundario

Diferentes publicaciones reportan que pacientes caninos con CME sufren de cambios hematológicos, principalmente trombocitopenia, anemia e hiperproteinemia (S Harrus, Waner, & Neer, 2013; Neer et al., 2002; Villaescusa et al., 2015). Para el día 0 del estudio, los ejemplares caninos con CME que conformaron los dos grupos aleatorizados presentaron parámetros normales similares sin cambios estadísticamente significativos entre ellos (niveles hematológicos inferiores a los valores de referencia en caninos para los parámetros eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, HCM, CHbCM y plaquetas; y superiores en los valores de proteínas plasmáticas). Luego de una semana de tratamiento los valores hematológicos (exceptuando los niveles de proteínas plasmáticas), se reestablecieron en los parámetros reportados como normales para la especie, en el grupo del microencapsulado. Las proteínas plasmáticas disminuyeron a valores normales solo hasta el día 17 del inicio del estudio. En los ejemplares caninos que hicieron parte del grupo control, los parámetros hematológicos hemoglobina, hematocrito y CHbCM registraron valores considerados normales luego de 6 días de tratamiento, en el parámetro eritrocitos luego de 11 días, el valor de las plaquetas aumentó en promedio a niveles normales para el día 17; y finalmente para los valores de proteínas plasmáticas (grupo control) y HCM se reestablecieron los valores normales en los perros estudiados solo hasta el día 22. Villaescusa y colaboradores le atribuyeron el incremento en el conteo de eritrocitos y hemoglobina (y posiblemente el conteo plaquetario y el parámetro HCM) al efecto antimicrobiano mismo de la doxiciclina (Villaescusa et al., 2015). El presente estudio demostró que el tratamiento con doxiciclina (tanto para el grupo intervenido con el microencapsulado como para el grupo control) resultó en un aumento en el recuento de plaquetas y eritrocitos en perros afectados por CME, al igual que en estudios previamente reportados en

ejemplares caninos infectados experimentalmente con la bacteria (Eddlestone et al., 2007; Shimon Harrus et al., 2004; Neer et al., 2002). Después de la iniciación de tratamiento con doxiciclina, los recuentos de plaquetas volvieron a la normalidad. Harrus y colaboradores detectaron un efecto rebote de los niveles de plaquetas durante el tratamiento realizado en ejemplares caninos con CME (Shimon Harrus et al., 2004); En el presente estudio este efecto se observó en tres de los cuatro ejemplares caninos estudiados, sin embargo este fenómeno se evidenció desde el día 6 hasta el día 22 de tratamiento en donde las plaquetas volvieron a reestablecerse a niveles normales para la especie. En este caso el rango de referencia normal es un predictor positivo para el éxito de la terapéutica, mas no indica recuperación en los niveles plaquetarios antes de la finalización del tratamiento completo con doxiciclina. A diferencia de lo que se encuentra reportado, la creatinina en los ejemplares caninos se mantuvo en valores normales para la especie en los dos grupos durante los 28 días de intervención. Varios autores reportan que la creatinina puede progresivamente disminuirse por el efecto de la doxiciclina sobre las nefronas y se ha determinado que este antibiótico ejerce una acción de reducción en la injuria oxidativa ayudando a promover la reparación renal por reducción en los niveles de citoquinas proinflamatorias e inhibición de las metaloproteinasas de matriz (Ihtiyar et al., 2011; Kucuk et al., 2009; Villaescusa et al., 2015). Es posible que la ausencia de cambios en el parámetro renal no se haya dado debido a que la totalidad de los perros estudiados en el tiempo 0 no presentaron un aumento anormal en el análisis químico en el momento del inicio de la investigación. Gran parte de los análisis realizados a través del estudio no demostraron diferencias estadísticamente significativas en los indicadores hematológicos entre los tratamientos microencapsulado y control. No hubo diferencias respecto al tiempo de tratamiento al comparar las dos intervenciones. Sin embargo, al analizar los cambios en los parámetros hematológicos entre el día tiempo 0 y día 28 de tratamiento, se encontraron

diferencias significativas respecto a los valores de plaquetas y de proteínas plasmáticas. Este efecto, se pudo dar principalmente por la acción bacteriostática de la doxiciclina y el restablecimiento fisiológico en los valores normales hematológicos a través de los días de intervención (Villaescusa et al., 2015).

Desenlace terciario

Se definió por la inferencia en la equivalencia en los efectos bacteriostáticos en pacientes con CME definida como la amplificación de copias de DNA del gen 16S rRNA por qPCR comparada con un control positivo durante 28 días de tratamiento, manteniendo la concentración plasmática de doxiciclina en sangre por encima de MIC (0,03 ug/Kg) detectada por HPLC acoplada a espectrometría de masas. Los resultados de este ensayo demostraron que el número de copias de DNA de *Ehrlichia canis* descendió de manera constante durante las primeras 48 horas donde apenas fue perceptible la amplificación del gen por encima de la línea Ct. Después de 48 horas de tratamiento no se detectó DNA genómico del microorganismo en ninguno de los dos tratamientos. Desde los primeros 30 minutos de administración y hasta el final de las intervenciones (28 días), la concentración sérica de doxiciclina se mantuvo por encima de la concentración mínima inhibitoria. Eddlestone y colaboradores realizaron un ensayo clínico en ejemplares caninos positivos a *Ehrlichia canis* por PCR, en donde estudiaron los efectos bacteriostáticos de la doxiciclina, demostrando la presencia del microorganismo en el segundo día, en la totalidad de los ejemplares caninos muestreados, al igual que en la presente investigación. Sin embargo, reportaron que en uno (1/9) de los ejemplares tratados se detectó DNA de *Ehrlichia canis* luego de 9 días de haber iniciado el tratamiento. Luego de este evento y hasta la finalización del ensayo no reportaron amplificación de DNA del microorganismo (Eddlestone et al., 2007). Los resultados del presente

estudio también son similares a lo publicado por Breitschwerdt y colaboradores, quienes concluyeron la efectividad del tratamiento con doxiciclina en la infección de CME (Breitschwerdt, Hegarty, & Hancock, 1998). Sin embargo, Harrus y colaboradores en el 2004, determinaron en 5 ejemplares caninos infectados experimentalmente (tratados con doxiciclina a 10 mg/Kg por vía oral), la detección de DNA de *Ehrlichia canis* luego de 16 días postratamiento. Este resultado pudo haber sido diferente al presente estudio ya que los autores reportaron la infección gracias al uso de aspirados esplénicos (Shimon Harrus et al., 2004), sugiriendo la importancia de este tipo de muestreos en bazo, para el diagnóstico de caninos con CME (Shimon Harrus et al., 1998). La detección prolongada en el estudio en tejido esplénico de perros, durante el tratamiento con doxiciclina puede reflejar la presencia de un número mayor de organismos ehrlichiales en macrófagos esplénicos que en la sangre en algunos estadios de la CME, y la posibilidad de obtener falsos negativos en muestras de sangre. El número de copias de DNA en el presente estudio fue mayor a lo reportado por Baneth y colaboradores (Baneth, Harrus, Ohnona, & Schlesinger, 2009), y similares a los obtenidos en otro modelo rickettsial por Eemereva y colaboradores (Eremeeva, Dasch, & Silverman, 2003). Se obtuvieron valores con poca variabilidad intragrupal durante los dos primeros días, sin embargo, se evidenció que los perros que hicieron parte del grupo control contaba con un menor número de copias de DNA de *Ehrlichia canis*, en comparación al grupo microencapsulado. A pesar de haberse obtenido valores cuantificables durante el tercero y cuarto día de tratamiento, el ruido generado posiblemente por dímeros de primers o por amplificaciones inespecíficas en el qPCR, impidió analizar estos resultados. Aunque fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas al segundo día de tratamiento al comparar las intervenciones, los resultados deberían ser analizados con prudencia ya que las curvas de disociación (“melting”), obtenidas presentan perfiles de desnaturalización luego del tercer día con

valores de Tm cercanos a productos inespecíficos y a valores considerados como negativos en el protocolo de qPCR.

Limitaciones

El evento diarrea no fue tenido en cuenta para este estudio ya que los ejemplares caninos 15 días antes del ensayo preclínico, presentaron parásitos digestivos. Luego de cumplir con el protocolo de desparasitación, 3 ejemplares presentaron el evento una semana antes del estudio. Desde el tiempo 0 y durante la totalidad de la investigación se evidenció en un perro un evento de diarrea a los 7 días de haberse iniciado del ensayo preclínico. Este evento pudo haber sido causado por diversos motivos externos y no fue posible atribuírselo al uso de doxiciclina, a parásitos digestivos, a la desparasitación instaurada, a la dieta establecida, al consumo de algún material extraño en los paseos rutinarios o a la presencia de CME. Uno de los ejemplares presentó eosinofilia al finalizar el estudio en el grupo en el que se utilizó el microencapsulado, con valores por encima de 3000 eosinófilos/ μ l. La eosinofilia presentada en este grupo se dio por una alta variabilidad en los resultados debido al bajo número de ejemplares que lograron contar con los criterios de inclusión para ser reclutados. La causa de eosinofilia en el ejemplar canino que la presentó no pudo ser determinada. La sensibilidad obtenida respecto a la detección por qPCR de DNA de *Ehrlichia canis* fue similar a otros estudios, sin embargo, se da una diferencia en los días de detección cuando se comparan los resultados con publicaciones donde las muestras se obtuvieron directamente de aspirados esplénicos. Esto indica la importancia del uso de muestreos a nivel del bazo con el fin de determinar la eliminación completa de DNA ehrlichial, y una mejor inferencia en el éxito del tratamiento. La cuantificación de copias de DNA del gen 16S rRNA, podría ser útil para el diagnóstico de *Ehrlichia canis* antes de un tratamiento antibiótico, o en los dos primeros días de

antibioterapia. Posterior a este tiempo la generación de productos inespecíficos o de ruido generado por posibles dímeros de primers pueden ofrecer datos erróneos en el proceso de la cuantificación de DNA.

Conclusiones

El estudio demostró que el microencapsulado (Formicrodox) no tiene diferencias significativas con la Doxiciclina Hiclato Comercial que se encuentra en el mercado respecto a diversos indicadores de seguridad (presencia y ausencia de efectos indeseables). Se deben realizar estudios clínicos que puedan ser llevados a cabo en un mayor número de ejemplares caninos y que confirmen la eficacia y eficiencia de esta estrategia innovadora, con el fin de considerar el microencapsulado en un escenario comercial a futuro.

Referencias

- Almazán, C., González-Álvarez, V. H., Fernández de Mera, I. G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & De la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>
- Almeida, A. P., Marcili, A., Leite, R. C., Nieri-Bastos, F. A., Domingues, L. N., Martins, J. R., & Labruna, M. B. (2012). Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(4), 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.02.003>
- Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F. S., & Schlesinger, Y. (2009). Longitudinal quantification of

- Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology*, 136, 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.022>
- Bartlett, J. G., Bustetter, L. A., Gorbach, S. L., & Andrew, B. (1975). Comparative Effect of Tetracycline and Doxycycline on the Occurrence of Resistant *Escherichia coli* in the Fecal Comparative Effect of Tetracycline and Doxycycline on the Occurrence of Resistant *Escherichia coli* in the Fecal Flora, 7(1), 55–57. <https://doi.org/10.1128/AAC.7.1.55>. Updated
- Bouza-Mora, L., Dolz, G., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J. J., Salazar-Sánchez, 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>
- Breitschwerdt, E., Hegarty, B., & Hancock, S. (1998). Doxycycline Hyclate Treatment of Experimental Canine Ehrlichiosis Followed by Challenge Inoculation with Two *Ehrlichia canis* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), 362–368.
- Brouqui, P., & Raoult, D. (1990). In Vitro Susceptibility of *Ehrlichia sennetsu* to Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(8), 1593–1596.
- Cabrera, A. (2018). Detección molecular de microorganismos transmitidos por ectoparásitos en caninos procedentes de albergues de tres municipios del Valle de Aburra , Antioquia. *Trabajo de grado para optar por el título de Médica Veterinaria*, Corporación Universitaria Lasallista.
- Calvo, P., Lozano, M., Espinosa-Mansilla, A., & González-Gómez, D. (2012). In-vitro evaluation of the availability of π {variant}-3 and π {variant}-6 fatty acids and tocopherols from microencapsulated walnut oil. *Food Research International*, 48(1), 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.007>

- Chiers, K., Weyens, P., Deprez, P., Heerden, M. van, Meulemans, G., Baert, K., ... Ducatelle, R. (2004). Lingual and pharyngeal paralysis due to acute doxycycline intoxication in veal calves. *Veterinary Record*, 155(1), 25–26.
- Cicuttin, G. L., Tarragona, E. L., De Salvo, M. N., Mangold, A. J., & Nava, S. (2015). Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(6), 724–729. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.06.006>
- Cruz, A. C., Zweygarth, E., Ribeiro, M. F. B., Da Silveira, J. A. G., De La Fuente, J., Grubhoffer, L., ... Passos, L. M. F. (2012). New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-291>
- De la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., & Kocan, K. M. (2006). Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research*, 2, 24. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-24>
- Donatien, A., & Lestoquard, F. (1937). State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. *Arch Inst Pasteur Alger*, 15, 142–187.
- Eddlestone, S. M., Diniz, P., Gaunt, S., & Hosgood, G. (2007). Doxycycline Clearance of Experimentally Induced Chronic *Ehrlichia Canis* Infection in Dogs. *J Vet Intern Med*, 21, 1237–1242. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb01944.x>
- Eremeeva, M. E., Dasch, G. A., & Silverman, D. J. (2003). Evaluation of a PCR Assay for Quantitation of *Rickettsia rickettsii* and Closely Related Spotted Fever Group Rickettsiae.

Journal of Clinical Microbiology, 41(12), 5466–5472.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5466>

Gallego-Londoño, V. (2017). Desarrollo de un sistema de liberación controlada de doxiciclina a partir de dos prototipos de encapsulación: secado por aspersion y liposomas. *Trabajo de grado para optar por el título de Magister en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, Universidad de Antioquia.

Harrus, S, Waner, T., & Neer, M. (2013). Ehrlichia and A naplasma Infections. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4th Editio, pp. 227–259). Athens, Georgia: Elsevier. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Harrus, Shimon, Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T., & Shaw, S. (2004). Comparison of Simultaneous Splenic Sample PCR with Blood Sample PCR for Diagnosis and Treatment of Experimental *Ehrlichia canis* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4488–4490. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4488>

Harrus, Shimon, Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J. E., Poland, A. M. Y. M., & Bark, H. (1998). Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 73–76.

Hidrón, A., Muñoz, F., & Vega, J. (2014). Asociación Colombiana de Infectología Primer caso de ehrlichiosis monocítica humana reportado en Colombia, 18(4), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.001>

Ihtiyar, E., Yaşar, N. F., Erkasap, N., Köken, T., Tosun, M., Öner, S., & Erkasap, S. (2011). Effects of doxycycline on renal ischemia reperfusion injury induced by abdominal compartment syndrome. *Journal of Surgical Research*, 167(1), 113–120.

<https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.09.048>

Inokuma, H., Fujii, K., Okuda, M., Onishi, T., Beaufils, J., Raoult, D., & Brouqui, P. (2002).

Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon. *Society*, 9(5), 1132–1136.

<https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.1132>

Jefferies, R., Ryan, U., Muhlneckel, C, P. J. (2003). Two Species of Canine Babesia in Australia:

Detection and Characterization by PCR. *The Journal of Parasitology*, 89(2), 409–412.

[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0397:SOAUSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0397:SOAUSO]2.0.CO;2)

Kucuk, A., Kabadere, S., Tosun, M., Koken, T., Kinaci, M. K., Isikli, B., & Erkasap, N. (2009).

Protective effects of doxycycline in ischemia/reperfusion injury on kidney. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65(2), 183–191. <https://doi.org/10.1007/BF03179069>

Latimer, K., Prasse, K., & Mahaffey, E. (2005). *Patologia clinico veterinaria. Duncan & Prasse's patología clínica veterinaria* In-Multimedia.

Lepper MH, Zimmerman HJ, Carroll G, Caldwell ER Jr, Spies HW, Wolfe CK, D. H. (1951).

Effect of large doses of aureomycin, terramycin, and chloramphenicol on livers of mice and dogs. *AMA Arch Intern Med.*, 88(3), 284–295.

Little, S. E. (2017). Ehrlichiosis. In C. Brisola (Ed.), *Arthropod Borne Diseases* (pp. 205–213).

Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8>

Mazabel-Riera, E. (2017). Comparación de concentraciones plasmáticas de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato in vitro y en biomodelo canino mediante HPLC. *Trabajo de grado para optar por el título de Médica Veterinaria, Corporación Universitaria Lasallista.*

- 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>
- Mackin, A., & Littlewood, J. (2000). *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion*. (M. B. S. A. V. Association., Ed.).
- Neer, T., Breitschwerdt, E., Greene, R., & Lappin, M. (2002). ACVIM Consensus Statement. *J Vet Intern Med*, 16, 309–315.
- Peleg, O., Baneth, G., Eyal, O., Inbar, J., & Harrus, S. (2010). Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Parasitology*, 173(3–4), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.039>
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 110–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>
- Posada-Zapata, J., Cabrera J, A., González–Alvarez, D., Rodas G, J., Monsalve B, S., & Londoño B, A. (2017). Identificación de bacterias de la familia Anaplasmataceae en un albergue canino del municipio de Caldas, Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), 6014. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1071>
- Prince, L. K., Shah, A. A., Martinez, L. J., & Moran, K. A. (2007). Ehrlichiosis: making the diagnosis in the acute setting. *Southern Medical Journal*, 100(8), 825–828. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e31804aa1ad>

- Riond, J. L., Vaden, S. L., & Riviere, J. E. (1990). Comparative Pharmacokinetics of Doxycycline in Cats and Dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *13*(4), 415–424.
- Schölkens, B. Gerhards, H. Lindner, E. (1971). Circulatory effects of intravenously administered rolitetracycline and other tetracyclines in animal experiments. *Arzneimittel-Forschung*, *24*(3), 312–317. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Schulz, B. S., Hupfauer, S., Ammer, H., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2011). Suspected side effects of doxycycline use in dogs - a retrospective study of 386 cases. *The Veterinary Record*, *169*(9), 229. <https://doi.org/10.1136/vr.d4344>
- Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). Antimicrobianos. In *Farmacología veterinaria*. 236–247.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tavares, R., et al. (2011). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.*, *17*, 239–248.
- Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *11 Suppl 2*, S81–S91. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00166-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00166-4)
- Unver, A., Perez, M., Orellana, N., Huang, H., & Rikihisa, Y. (2001). Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(8), 2788–2793. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2788-2793.2001>

- Villaescusa, A., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., Tesouro, M. Á., & Sainz, Á. (2015). Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 204(3), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.031>
- Waner, T., Nachum-Biala, Y., & Harrus, S. (2014). Evaluation of a commercial in-clinic point-of-care polymerase chain reaction test for *Ehrlichia canis* DNA in artificially infected dogs. *Veterinary Journal*, 202(3), 618–621. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.004>

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos permitieron describir la farmacocinética y demostrar la seguridad de una nueva formulación microencapsulada para la liberación de doxiciclina en el biomodelo canino (Formicrodox).

El microencapsulado no tuvo diferencias estadísticamente significativas con la doxiciclina hiclato comercial luego del estudio de comparación de parámetros farmacocinéticos. Al comparar las concentraciones en los diferentes ensayos preclínicos se pudo demostrar que el suministro de alimento pudo disminuir la absorción y la biodisponibilidad de la doxiciclina. Las concentraciones séricas siempre se consideraron terapéuticamente óptimas, indicadas por el cociente $AUC_{0-24}:MIC$. Gracias a la metodología utilizada en el presente estudio (cromatografía acoplada a espectrometría de masas), los datos obtenidos podrían representar una mayor plausibilidad en los valores de detección, ya que el uso de técnicas indirectas para este tipo de investigaciones podría sobreestimar las concentraciones reportadas.

Los hallazgos del presente estudio indican que la terapia con doxiciclina podría estar relacionada con los efectos secundarios gastrointestinales tanto para el grupo de intervención como para el grupo control. Cada grupo tuvo en total un número de 3 eventos de vómito durante los 28 días de tratamiento. A pesar de esto, no existieron diferencias significativas entre los dos grupos. El número de eventos presentados durante el tratamiento confirmó que el vómito fue el principal efecto adverso luego del uso de este antibiótico por vía oral. Los valores plaquetarios y de proteínas plasmáticas se restablecieron luego de los 28 días de tratamiento en los dos grupos intervenidos. Se evidenció, tanto en el microencapsulado como el grupo control, la efectividad bacteriostática de las moléculas durante el tiempo de tratamiento.

Formicrodox podría ser una estrategia útil ya que se puede elaborar con componentes de bajo costo y de fácil acceso. Se deben realizar estudios clínicos que puedan ser llevados a cabo en un mayor número de ejemplares caninos y que confirmen la eficacia y eficiencia de esta estrategia innovadora, con el fin de considerar el microencapsulado en un escenario comercial a futuro.

Anexo 1. Aval del Comité de Ética para la Experimentación con Animales.

Caldas, 7 de junio de 2013

Investigador
Santiago Monsalve Buriticá
Corporación Universitaria Lasallista
Caldas

Cordial saludo:

El Comité de Ética para Experimentación con Animales adscrito a la Vicerrectoría de Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista, hace constar que en la sesión realizada el día 6 de junio de 2013 sometió a evaluación el proyecto titulado **"Nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la ehrlichiosis canina utilizando un sistema nanoestructurado para la liberación de doxiciclina"**. El comité decidió dar su concepto favorable sin objeción para su realización y presentación a la convocatoria 562 de Colciencias.

A su vez este Comité estará en proceso constante de control y seguimiento de este proyecto, verificando que las condiciones presentadas para aval se cumplan de manera efectiva, teniendo en cuenta las debidas consideraciones éticas.

Atentamente,


Luis Fernando García Giraldo
Vicerrector de Investigación


Cristian Alejandro Castillo Franz
Secretario Comité

Copia: Comité de Ética para Experimentación con Animales.



www.lasallista.edu.co