

## M. Farmacología

### M1 Determinación in vivo de la actividad bactericida de dos productos genéricos (PG) de Ceftazidime (TAZ) comparados con el compuesto original (CO) en el modelo murino neutropénico de infección del muslo (MMNIM) contra dos especies de bacilos Gram Negativos.

Agudelo M, Zuluaga AF, Rodríguez CA, Salazar B, Vesga O, GRIPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**Introducción:** los PG antibacterianos pueden diferir del CO en equivalencia terapéutica (ET) dependiendo del germen, aun siendo equivalentes farmacéuticos (EF). Comparamos la magnitud de los parámetros farmacodinámicos (PD) de los PG de TAZ con los del CO mediante determinación de su eficacia bactericida in vitro e in vivo contra 2 cepas clínicas susceptibles a TAZ. **Materiales y métodos:** para EF se compararon curvas estándar (ensayo microbiológico: *Difco Antibiotic Medium 1 + E. coli* ATCC 25922) y MIC/MBC (microdilución). Para ET se infectaron por producto 16 hembras MPF, cepa Udea:ICR(CD-1), neutropénicas, inoculadas con *E. coli* SIG-1 (Eco) ó *P. aeruginosa* GRP-0019 (Pae). TAZ q1h vía SC se inició 2h post-infección, 5 ó más dosis totales, 0.586-150 mg/kg/24h. Los parámetros PD efecto máximo ( $E_{max}$ ), dosis bacteriostática in vivo (BD), y dosis requerida para matar 1 (1LKD) ó 2 (2LKD)  $\log_{10}$  CFU/g sirvieron para comparar la eficacia de cada PG con la del CO. **Resultados:** el análisis de ajuste de curvas (CFA) demostró falla en EF para ambos PG respecto al CO, pues contenían entre 113 y 252% mayor concentración de TAZ ( $P < 0.0015$ ). Las MIC/MBC de los PG contra Eco y Pae fueron iguales a las del CO. Al iniciar TAZ en el MMNIM la carga bacteriana era 7.26 (Eco) y 4.02 (Pae)  $\log_{10}$  CFU/g. In vivo, 1 de 2 PG fue igual al CO contra Eco (BD=1.80 vs 2.02, 1LKD=6.81 vs 7.21, 2LKD=24.1 vs 26.2 mg/kg/24h) pero inferior contra Pae: BD=20.8 vs 15.4 mg/kg/24h,  $P=0.0106$  por CFA del parámetro BD. El otro PG sólo se probó contra Pae, y su eficacia bactericida fue superior a la del CO: BD=12.5 vs 15.4 mg/kg/24h,  $P=0.0468$  por CFA. El inóculo relativamente bajo (4.02  $\log_{10}$  CFU/g a 0h) de Pae impidió calcular 1LKD y 2LKD. **Conclusión:** ninguno de 2 PG de TAZ comercializados en Colombia es EF del CO, pues contienen mayor concentración del principio activo. Esto genera igualdad en su efecto in vivo contra Eco, mas no contra Pae, un germen más exigente para cualquier antibacteriano. Estos datos demuestran la inutilidad de la EF para predecir la ET.

### M2 Determinación in vivo de la actividad bactericida de tres productos genéricos (PG) de Vancomicina (VAN) comparados con el compuesto original (CO) en el modelo murino neutropénico de infección del muslo (MMNIM).

Vesga O, Agudelo M, Rodríguez CA, Salazar B, Restrepo A, Zuluaga AF. GRIPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**Introducción:** la OMS y agencias reguladoras aceptan la equivalencia farmacéutica (EF) como prueba de equivalencia terapéutica (ET) para PG parenterales, presunción nunca demostrada. Comparamos la magnitud de los parámetros farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) de los PG de VAN con el CO mediante determinación de su eficacia bactericida in vitro e in vivo. **Materiales y métodos:** para EF se compararon curvas estándar (ensayo microbiológico: *Difco Antibiotic Medium 8 + B. subtilis* ATCC 6633), MIC/MBC, curvas bactericidas dinámicas (TKC), y PK sérica y en muslo sano e infectado. Para ET el MMNIM empleó por producto 16 hembras MPF cepa Udea:ICR(CD-1), neutropénicas, inoculadas con *S. aureus* GRP-0057. VAN q1h vía SC se inició 2h post-infección, cinco ó más dosis totales, 0.037-1200 mg/kg/24h. Los parámetros PD efecto máximo ( $E_{max}$ ), dosis bacteriostática in vivo (BD), y dosis bactericida de 1 (1LKD) y 2 (2LKD)  $\log_{10}$  CFU/g determinaron in vivo la eficacia de cada producto. **Resultados:** el análisis de ajuste de curvas (CFA) demostró falla en EF para 1 PG que contenía 125% mayor concentración de VAN que el CO. In vitro y bajo condiciones estándar, MIC/MBC, TKC y PK sérica y de muslo sano fueron iguales a las del CO. Bajo hipoxia y con pH ácido, MIC/MBC de los 3 PG fueron significativamente superiores a las del CO, y sus niveles en muslo infectado fueron muy inferiores:  $C_{max}=1.5-9.8\%$  y  $AUC=0-24.8\%$  respecto al CO ( $P < 0.05$  ANOVA). Al iniciar VAN en el MMNIM la carga bacteriana era 4.12-4.66  $\log_{10}$  CFU/g. La eficacia bactericida in vivo fue inferior para los 3 PG respecto al CO:  $E_{max}=2.04-3.48$  vs  $5.25 \log_{10}$  CFU/g,  $P=0.0002$  por *POWAGS Test* y *WMW Test* (ineficacia de los PG impide el análisis paramétrico). En realidad, los tres PG de VAN sólo lograron efecto bacteriostático contra *S. aureus*, mientras el CO mató en promedio más de 2  $\log_{10}$  CFU/g. **Conclusión:** la EF no predice la ET de los PG de VAN, y la magnitud de la diferencia podría ocasionar fallas terapéuticas fatales en pacientes críticos. Los bajos niveles de VAN en tejido infectado explicarían por qué, aun siendo EF, los PG son ineficaces in vivo. Los estudios in vitro sugieren que el pH ácido y la hipoxia, propios de los tejidos infectados, impiden la unión de los PG de VAN a su ligando en *S. aureus*.



**M3 Determinación in vivo de la actividad bactericida de 10 productos genéricos (PG) de Amikacina (AMK) comparados con el compuesto original (CO) en el modelo murino neutropénico de infección del muslo (MMNIM).**

Zuluaga AF, Salazar B, Rodríguez CA, Agudelo M, Vesga O. *GRIPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.*

**Introducción:** casi todo gobierno acepta equivalencia farmacéutica (EF) como prueba de equivalencia terapéutica (ET) para PG parenterales, presunción nunca sometida a reto experimental. Comparamos la magnitud de los parámetros farmacodinámicos (PD) de los genéricos de AMK con la del CO mediante determinación de su eficacia bactericida in vitro e in vivo. **Materiales y métodos:** para probar la EF se compararon curvas estándar (ensayo microbiológico: *Difco Antibiotic Medium 5 + B. subtilis* ATCC 6633) y MIC/MBC (microdilución en caldo). Para probar ET, el MMNIM empleó por producto 16 ratones hembra, cepa Udea:ICR(CD-1), neutropénicas, inoculadas con *E. coli* SIG-1. AMK q6h vía SC se inició 2h post-infección, 5 ó más dosis totales, 1.5-3072 mg/kg/24h. Los parámetros PD efecto máximo ( $E_{max}$ ), dosis bacteriostática in vivo (BD), y dosis requerida para matar 1 (1LKD) ó 2 (2LKD)  $\log_{10}$  CFU/g sirvieron para comparar la eficacia de cada PG con la del CO. **Resultados:** el análisis de ajuste de curvas (CFA) realizado a 5 PG de AMK demostró su EF con el CO. MIC/MBC contra *E. coli* SIG-1 fueron iguales al CO para 9 de 10 PG, 1 fue inferior: 19/23 vs 1.6/1.8 mg/l del CO ( $P=0.01$ , *Wilcoxon-Mann-Whitney Test*). Al iniciar AMK en el MMNIM la carga bacteriana era 6.84-8.15  $\log_{10}$  CFU/g y, en contraposición a los estudios in vitro, la eficacia bactericida in vivo fue inferior para 4 de los 10 PG respecto al CO: BD=198-573 vs 152 mg/kg/24h,  $E_{max}$  5.14-5.99 vs 6.83  $\log_{10}$  CFU/g,  $P<0.0015$  por CFA. Los otros 6 PG de AMK fueron ET del CO. **Conclusión:** la EF no predice la ET de todos los PG de AMK. Es imposible determinar a priori cuáles PG serán eficaces in vivo, por tanto su empleo clínico pondría en riesgo a los enfermos más graves. La ET de todo PG de AMK debe determinarse in vivo antes de autorizar su comercialización para uso humano o veterinario.

**M4 Determinación in vivo de la actividad bactericida de siete productos genéricos (PG) de Ceftriaxone (CRO) comparados con el compuesto original (CO) en el modelo murino neutropénico de infección del muslo (MMNIM).**

Rodríguez CA, Zuluaga AF, Salazar B, Agudelo M, Vesga O. *GRIPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.*

**Introducción:** la equivalencia farmacéutica (EF) como prueba de equivalencia terapéutica (ET) para PG parenterales es un dogma ampliamente difundido y aceptado, pero nunca se ha retado experimentalmente. Comparamos la magnitud de los parámetros farmacodinámicos (PD) de los genéricos de CRO con los del CO mediante determinación de su eficacia bactericida in vitro e in vivo. **Materiales y métodos:** para probar la EF se compararon curvas estándar tras ensayo microbiológico (EM) con *Difco Antibiotic Medium 1 + S. aureus* ATCC 6538p y se determinó la susceptibilidad por microdilución en caldo. Para probar la ET, el MMNIM empleó por producto 16 hembras MPF de la cepa Udea:ICR(CD-1), neutropénicas, inoculadas con *E. coli* SIG-1. CRO q3h y q6h vía SC se inició 2h post-infección, cinco ó más dosis totales, 0.147-150 mg/kg/24h. Los parámetros PD efecto máximo ( $E_{max}$ ), dosis necesaria para 50% de  $E_{max}$  ( $P_{50}$ ), dosis

bacteriostática in vivo (BD), y dosis requerida para matar 1 (1LKD) ó 2 (2LKD)  $\log_{10}$  CFU/g sirvieron para comparar la eficacia de cada PG con la del CO. **Resultados:** se realizó EM para cuatro de siete PG de CRO, y 3 fallaron EF por análisis de ajuste de curvas (CFA) al contener 129-151% mayor concentración de CRO ( $P<0.05$ ). Las MIC/MBC de los PG contra *E. coli* SIG-1 fueron iguales a las del CO. Al iniciar CRO en el MMNIM la carga bacteriana era 7.26-7.58  $\log_{10}$  CFU/g. Dosificando q3h, sólo 1 PG sin EM difirió in vivo del CO, superándolo (2LKD=2.32 vs 4.34,  $P=0.0486$  por CFA), pero no hubo diferencia bajo el esquema q6h. Dosificando q6h, 1 PG que contenía más CRO fue inferior (2LKD=5.81 vs 3.84;  $P=0.0377$ ) y 1 sin EM fue superior al CO (2LKD=2.78 vs 3.84 mg/kg/24h;  $P=0.0326$ ); los otros 5 fueron iguales. De 7 PG, 4 fueron ET del CO bajo ambos ED, pero 1 tenía más CRO y en los otros 3 no se determinó la EF. **Conclusión:** aunque algunos PG de CRO contienen mayor concentración de principio activo, su eficacia bactericida in vivo puede ser superior o inferior respecto al CO. No se demostraron cambios consistentes en eficacia al optimizar el índice PK/PD del medicamento. Los resultados sugieren la necesidad de determinar tanto EF como ET de los PG de CRO antes de autorizar su uso en humanos.

**M5 Determinación in vivo de la actividad bactericida de cinco productos genéricos (PG) de Cefotaxime (TAX) comparados con el compuesto original (CO) en el modelo murino neutropénico de infección del muslo (MMNIM).**

Zuluaga AF, Salazar B, Rodríguez CA, Agudelo M, Vesga O. *GRIPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.*

**Introducción:** la equivalencia farmacéutica (EF) como prueba de equivalencia terapéutica (ET) para PG parenterales es un dogma ampliamente difundido y aceptado, pero nunca se ha retado experimentalmente. Comparamos la magnitud de los parámetros farmacodinámicos (PD) de los genéricos de TAX con el CO mediante determinación de su eficacia bactericida in vitro e in vivo. **Materiales y métodos:** para probar la EF se compararon curvas estándar (ensayo microbiológico: *Difco Antibiotic Medium 1 + S. aureus* ATCC 6538p) y MIC/MBC (microdilución en caldo). Para probar la ET, el MMNIM empleó por producto 16 hembras MPF, cepa Udea:ICR(CD-1), neutropénicas, inoculadas con *E. coli* SIG-1. TAX q1h vía SC se inició 2h post-infección, cinco ó más dosis totales, 0.586-150 mg/kg/24h. Los parámetros PD efecto máximo ( $E_{max}$ ), dosis necesaria para 50% de  $E_{max}$  ( $P_{50}$ ), pendiente de curva dosis-efecto (N), dosis bacteriostática in vivo (BD), y dosis requerida para matar 1 (1LKD) ó 2 (2LKD)  $\log_{10}$  CFU/g sirvieron para comparar la eficacia de cada PG con la del CO. **Resultados:** el análisis de ajuste de curvas (CFA) demostró la EF de los 5 PG de TAX con el CO. Las MIC/MBC de los PG contra *E. coli* SIG-1 también fueron iguales a las del CO,  $P>0.05$  por *Kruskal-Wallis Test*. Al iniciar TAX en el MMNIM la carga bacteriana era 7.26-7.58  $\log_{10}$  CFU/g. La eficacia bactericida in vivo de cada PG fue igual a la del CO:  $E_{max}$ =4.92-5.34 vs 4.98  $\log_{10}$  CFU/g, BD=0.62-1.87 vs 1.35, 1LKD=2.50-5.76 vs 4.67, y 2LKD=9.96-27.3 vs 19.0 mg/kg/24h;  $P>0.05$  por CFA para estos 4 parámetros PD. En el caso de TAX, se demostró que los PG son equivalentes farmacéuticos y terapéuticos del CO. **Conclusión:** TAX es el único antibacteriano parenteral para el cual la ET puede predecirse a partir de la EF.

**M6 Determinación de la actividad bactericida de ocho productos genéricos (PG) de Ampicilina (AMP) comparados con el compuesto original (CO) en el modelo murino neutropénico de infección del muslo (MMNIM).**

Zuluaga AF, Salazar B, Rodríguez CA, Agudelo M, Vesga O. *GRIFE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.*

**Introducción:** la OMS y agencias reguladoras del mundo aceptan la equivalencia farmacéutica (EF) como prueba de equivalencia terapéutica (ET) para PG parenterales, presunción nunca demostrada. Comparamos la magnitud de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los PG de AMP con el CO mediante determinación de su eficacia bactericida in vitro e in vivo. **Materiales y métodos:** para probar la EF se compararon curvas estándar tras ensayo microbiológico (EM) con *Difco Antibiotic Medium 11 + M. luteus* ATCC 9341 y se determinó la susceptibilidad por microdilución en caldo. Para probar la ET el MMNIM empleó ratones hembra MPF inoculadas con *E. coli* SIG-1. AMP q1h via SC se inició 2h post-infección, cinco ó más dosis totales, 2.34-600 mg/kg/24h. Los parámetros farmacodinámicos efecto máximo ( $E_{max}$ ), dosis bacteriostática in vivo (BD), y dosis bactericida de 1 (1LKD) ó 2 (2LKD)  $\log_{10}$  CFU/g sirvieron para comparar in vivo la eficacia de cada genérico con la del original. **Resultados:** se realizó EM para siete de ocho PG de CRO, y tres fallaron EF por análisis de ajuste de curvas (CFA) al contener 252-519% mayor concentración de AMP ( $P < 0.0087$ ), pero todos fueron inferiores in vivo, al igual que otros tres que fueron EF del CO: 1LKD=95-295 vs 72; 2LKD=188 a >600 vs 117 mg/kg/24h;  $P < 0.004$  por CFA. La carga bacteriana en los muslos de los ratones era 7.02-7.49  $\log_{10}$  CFU/g al momento de iniciar el tratamiento con AMP. Los 2 PG restantes también mostraron menor eficacia bactericida in vivo frente al CO, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. **Conclusión:** la EF no predice la ET de todos los PG de AMP, pues su eficacia bactericida in vivo es inferior a la del CO independientemente de si contienen igual o mayor concentración de principio activo. La magnitud de la ineficacia de los PG equivaldría a tener que emplear dosis 32 a 700% mayores para matar 1-2 logaritmos de bacterias. Dicho concepto no tiene aplicación clínica, pues elevando la dosis de los PG de AMP no incrementa su eficacia antibacteriana in vivo.

## N. Micología

**N1 Purificación y caracterización parcial de una proteína de *Paracoccidioides brasiliensis* con capacidad de unión a Proteínas de Matriz Extracelular.**

González, MA, Hernández, O, Restrepo Moreno, A, Grupo de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB. Gómez G, BL, Díez Posada, S, Hamilton, AJ, Dermatology Department, Guy's and St. Thomas Hospital, King's College, London University. Cano, LE, Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Antioquia y Grupo de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB.

**Objetivo:** determinar la presencia de moléculas con capacidad de unión a proteínas de matriz extracelular (PMEC) en el hongo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), y posteriormente lograr su purificación y caracterización. **Materiales y métodos:** se analizaron diferentes extractos de micelio y levaduras de Pb (homogenizados totales, tratados con b-mercaptoetanol y SDS) por ensayos de afinidad de ligando para fibronectina, fibrinógeno y laminina. La proteína de unión a PMEC fue purificada utilizando electroforesis en gel preparativo. Adicionalmente, se realizó secuencia de aminoácidos de la región N-terminal y se produjo un anticuerpo monoclonal (AcM) el cual se utilizó en técnicas de western blot (WB), inmunofluorescencia (IF) e inmunomicroscopía electrónica (IME). Por otro lado, se realizaron ensayos de inhibición de la adherencia de conidias del hongo a PMEC inmovilizadas usando el AcM y la proteína purificada. **Resultados y discusión:** dos polipéptidos presentes en los extractos con SDS y con masas moleculares de 19 y 32-KDa, reaccionaron con las tres PMEC. Análisis de la región N-terminal de la proteína de 32-KDa, revelaron una homología sustancial con proteínas de *Histoplasma capsulatum* y *Neurospora crassa*. Adicionalmente, esta proteína fue reconocida por el AcM en los extractos con SDS vía WB. La IF mostró que este AcM reaccionó con las diferentes formas del hongo. Igualmente, la IME mostró la localización de esta proteína entre la membrana citoplasmática y la capa interna de la pared. En ensayos de inhibición, el AcM inhibió la adherencia de las conidias a las tres PMEC, mientras la proteína purificada solo inhibió la adherencia de las propágulas a laminina y fibronectina. **Conclusiones:** estos resultados demuestran la presencia de dos polipéptidos en la superficie del *P. brasiliensis* que interactúan con PMEC, lo que indica su posible papel como receptores comunes para las tres PMEC. Además, estas proteínas podrían ser claves en el proceso inicial de adherencia a las PMEC y células del hospedero, así como también en la diseminación de la paracoccidioidomicosis.