
Modelos experimentales en farmacodinamia

Fernando Fuentes Martínez^a, María José Giménez Mestre^b
y José Prieto Prieto^{a,*}

^aDepartamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

^bDepartamento Médico. SmithKline Beecham S.A. Madrid.

RESUMEN

La farmacodinamia estudia los efectos que los cambios en la concentración de un antimicrobiano inducen sobre los microorganismos. Este amplio campo de investigación puede ser dividido en dos apartados distintos, según la finalidad u objetivo del estudio: por un lado se hallarían los estudios de predicción de eficacia, que tratarían de encontrar parámetros que puedan proporcionar una indicación de la actividad del compuesto. De otra parte, se contaría con ensayos dirigidos a determinar uno o más parámetros de tipo farmacodinámico, como pueden ser el efecto postantibiótico o los efectos de concentraciones subinhibitorias sobre los microorganismos. Cada uno de estos apartados incluye modelos y técnicas tanto *in vitro*, como *ex vivo* o *in vivo*. Para el estudio de parámetros o indicadores de eficacia se utilizan modelos muy estandarizados y aceptados, como las simulaciones farmacocinéticas *in vitro*, la determinación de títulos bactericidas séricos o los modelos *in vivo* de sepsis intraabdominal, neumonía o lesión en el muslo de ratón. Sin embargo, para la determinación de parámetros farmacodinámicos específicos la estandarización es menor; tanto los modelos *in vitro* (curvas de muerte bacteriana modificadas) como *in vivo* (modelos de meningitis, endocarditis, lesión en muslo de ratón o neumonía) tienen metodologías variables y no permiten comparaciones significativas. Tanto los modelos *in vitro* como *ex vivo* presentan la ventaja de la comodidad y de la reproducibilidad, mientras que los estudios *in vivo* concuerdan más con la realidad clínica. Todos estos modelos han sido aplicados ampliamente en el estudio de numerosos antimicrobianos, y se han obtenido resultados muy interesantes.

Palabras clave:

Farmacodinamia. Farmacocinética. Efecto postantibiótico.

PHARMACODYNAMIC EXPERIMENTAL MODELS

Pharmacodynamics studies the effects that changes in antimicrobial concentrations induce on microorganisms. This investigational field of antimicrobial agents may be divided in two different areas according to the objectives/end-points to be studied: first, those studies of efficacy prediction, designed to determine parameters that provide information about the activity of the compound; second, those studies designed to investigate one or more pharmacodynamic parameters, such as the post-antibiotic effect or the effect of sub-inhibitory concentrations on microorganisms. Several standardised and wide-accepted techniques are used to determine activity predictor parameters, such as *in vitro* pharmacokinetic simulations, determination of serum bactericidal titres, or *in vivo* models including intraabdominal sepsis, pneumonia or thigh infection model in mice. Nevertheless, to determine specific pharmacodynamic parameters, lower standardised models have been used, and both *in vitro* (modified bactericidal curves) and *in vivo* (meningitis, endocarditis, pneumonia or thigh lesion models) have variable methodology that do not allow significant comparisons among them. The advantages of *in vitro* and *ex vivo* models are their high reproducibility and relative ease, while *in vivo* models are more closely related to clinical outcome. All these models have been widely applied in the study of antimicrobial agents, and a high number of interesting results have been obtained.

Key words:

Pharmacodynamic. Pharmacokinetic. Post-antibiotic effect.

*Correo electrónico: jprieto@eucmax.sim.ucm.es.

TABLA I
CLASIFICACIONES DE LOS MODELOS
EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN
FARMACODINAMIA ATENDIENDO
A DIVERSOS PARÁMETROS

Atendiendo a su finalidad
Modelos de predicción de eficacia
Modelos de evaluación de parámetros farmacodinámicos
Según su desarrollo
<i>In vitro</i>
<i>In vivo</i>
<i>Ex vivo</i>
Según la etapa de estudio del antimicrobiano
Modelos de cribado o de actividad frente a determinados grupos de patógenos (grampositivos, gramnegativos, etc.)
Modelos de determinación de eficacia de distintas dosificaciones
"Clásica"
Modelos básicos de cribado
Modelos <i>ex vivo</i>
Modelos monoparamétricos
Modelos discriminativos

Introducción

Los antimicrobianos, al contrario de los demás fármacos utilizados en otros campos de la medicina, tienen su diana en receptores que no son células o tejidos del propio paciente, sino de los microorganismos causantes de la infección. Esta diferencia básica conlleva una mayor complejidad en el estudio de la actividad de estas sustancias, ya que deben realizarse los estudios teniendo en cuenta tres componentes interactuantes: el paciente, el microorganismo y el antimicrobiano.

La *farmacodinamia* estudia la relación existente entre los cambios en la concentración del antimicrobiano y la respuesta que éstos tienen sobre el microorganismo. Desde hace algunas décadas, la farmacodinamia ha cobrado una gran importancia en el campo del estudio de los antimicrobianos, debido principalmente a dos hechos: la capacidad de obtener datos que pueden ser tomados como "predictores" de la eficacia del antimicrobiano (cociente inhibitorio, área sobre la curva/concentración mínima inhibitoria [CMI], etc.) y la posibilidad de estudiar ciertos parámetros que pueden ser utilizados en el diseño y mejora de los regímenes de dosificación

de los antimicrobianos (efecto postantibiótico [EPA] o efecto de concentraciones subinhibitorias, entre otros).

Para el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos se han utilizado multitud de modelos experimentales, muchos de los cuales se emplean también en el estudio de otras características de los procesos infecciosos (evolución de la infección, etc.).

Tipos de modelos

Estos modelos pueden clasificarse de distintas formas, atendiendo a diversas variables, como se describe en la tabla I. Pueden dividirse en modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, pero, además de esta clasificación, pueden agruparse según su finalidad: la predicción de eficacia y actividad o el estudio de parámetros determinados (EPA, sub-CMI, etc.). Existen otras clasificaciones "clásicas" de los modelos experimentales *in vivo* que son ampliamente aceptadas, como la de Zak et al¹, quienes prefieren agruparlos de la siguiente forma:

1. *Modelos básicos de cribado de antimicrobianos*: se utilizan como primeras investigaciones de un antimicrobiano, incluyéndose modelos como el de sepsis intraabdominal, neumonía, meningitis y lesión en el muslo en ratones.

2. *Modelos ex vivo*: permiten, mediante el implante de dispositivos (cámaras de diálisis o coágulos de fibrina) medir una serie de parámetros como la tasa de muerte, los cambios en la morfología bacteriana o las concentraciones de antimicrobiano de forma fácil y cómoda.

3. *Modelos monoparamétricos*: se refieren a modelos en los que se estudia de forma intensiva un solo parámetro o variable. Similares a los de cribado, son empleados en estados más avanzados de estudio de un compuesto antimicrobiano.

4. *Modelos discriminativos*: son los más complicados técnicamente, y están diseñados para tener una aproximación lo más real posible a los procesos infecciosos en humanos.

En el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos se utilizan múltiples modelos experimentales. Para su mejor descripción, se utilizará la clasificación mencionada anteriormente de *modelos farmacodinámicos para predicción de eficacia* y *modelos monoparamétricos de estudio de variables farmacodinámicas aisladas*. Cada uno de estos apartados incluye tanto modelos *in vitro* como *in vivo* o *ex vivo* (tabla II).

TABLA II
RESUMEN ESQUEMÁTICO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES Y TÉCNICAS *IN VITRO*
UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE LA FARMACODINAMIA DE ANTIMICROBIANOS

<i>Variable de estudio</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>In vivo</i>
Predicción de eficacia	<p>Curvas de muerte bacteriana (concentración constante)</p> <p>Curvas de muerte bacteriana (simulación farmacocinética)</p>	<p>Determinación título séricos</p> <p>Actividad bactericida sérica en curvas de muerte bacteriana</p>	<p>Modelo de sepsis intraperitoneal en ratones</p> <p>Modelo de neumonía en ratones</p> <p>Modelo de infección en el muslo de ratón neutropénico</p>
Efecto postantibiótico	<p>Curvas de muerte bacteriana <i>in vitro</i> con eliminación del antimicrobiano por dilución, inactivación o centrifugación</p>		<p>Modelo de infección en muslo de ratón neutropénico</p> <p>Modelo de meningitis en conejos</p> <p>Modelo de endocarditis en ratas</p> <p>Modelo de cámaras en conejos</p> <p>Modelo de piezas de algodón en ratones</p>
Efecto de concentraciones subinhibitorias	<p>Curvas de muerte bacteriana <i>in vitro</i> con eliminación del antimicrobiano por dilución, inactivación o centrifugación. Adición de concentraciones sub-CMI</p>		<p>Los mismos que en el apartado anterior pero con simulaciones farmacodinámicas</p>
Efecto sobre la morfología bacteriana	<p>Observación de células bacterianas tras exposición: en medios líquidos o sobre superficies sólidas o semisólidas</p>		<p>Observación de células bacterianas tras: infección intraperitoneal o meningitis en conejos</p>
Efecto sobre la producción de factores de virulencia	<p>Producción de exotoxina A, elastasa, fosforilasa, lipopolisacáridos</p>		
Efecto sobre la adherencia bacteriana	<p>A células epiteliales del tracto urinario</p> <p>A superficies plásticas</p>		
Inmunomodulación		<p>Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis</p> <p>Efecto posleucocitario (fase EPA)</p>	

Modelos utilizados en la predicción de eficacia

Modelos in vitro. Se emplean principalmente de forma exploratoria y ofrecen una información amplia sobre los posibles efectos del antimicrobiano. Destacan por su importancia los siguientes:

1. *Curvas de muerte bacteriana.* Generalmente, la técnica más empleada en el estudio farmacodinámico de un antimicrobiano. Esta técnica simple, en la que se enfrenta un microorganismo a concentraciones constantes de un antimicrobiano en condiciones de crecimiento óptimas, es uno de los primeros pasos a llevar a cabo en la investigación de la actividad “dinámica” de un compuesto, después de conocer, obviamente, su actividad “estática” (CMI o concentración mínima bactericida [CMB]). Sobre esta técnica se puede, sin embargo, incluir una serie de variantes que pueden ofrecer una dimensión más amplia y adaptada a la realidad *in vivo* (ensayo en presencia de células polimorfonucleares [PMN])^{2,3}. En estas curvas se pueden obtener diversos resultados, el más interesante de los cuales es el *porcentaje de reducción del inóculo inicial* a distintos tiempos del ensayo (la duración en total suele ser de 8-12 h) con distintas concentraciones (desde 1 a 10 o 20 veces la CMI).

2. *Curvas de muerte bacteriana con simulaciones farmacocinéticas.* La exposición a concentraciones constantes de antimicrobiano no muestra lo que realmente ocurre *in vivo*, donde los valores de estos compuestos son cambiantes a lo largo del intervalo de dosificación. Existen varios modelos que “simulan” estos valores, obteniéndose resultados más comparables y ajustados a la realidad: sistemas de “cultivo continuo”⁴ (mediante bombas peristálticas) y sistemas de filtración-centrifugación^{5,6}, como el Centriprep-10, en los que a distintos tiempos se elimina el antimicrobiano por filtración-centrifugación, añadiendo una nueva concentración hasta el siguiente tiempo, en el que se repite el proceso.

Al igual que en el caso anterior, la finalidad y objeto del estudio es observar la cinética de muerte bacteriana medida por la reducción del inóculo inicial, pero permiten establecer una relación con parámetros farmacocinéticos determinados previamente (relación con tiempo sobre CMI [$T > CMI$] o área bajo la curva [ABC], etc.).

Modelos ex vivo. Se considera dentro de este grupo a los modelos que emplean técnicas *in vitro* para estudiar muestras obtenidas *in vivo*. Se enumeran a continuación los más relevantes:

1. *Títulos bactericidas séricos*^{7,8}. Es quizá una de las técnicas que más se valoran en el estudio de la actividad de un antimicrobiano. Es una forma de “titulación” de la actividad que incluye como factores la concentración del antimicrobiano y su CMI frente al microorganismo. Se emplea generalmente para su determinación el suero de voluntarios que han recibido una dosis del antimicrobiano, y se obtiene la dilución máxima del suero que es capaz de matar al 99,9 % de las bacterias (con un período de incubación de 24 h), realizándose comparaciones según el tiempo de extracción del suero y la concentración de antimicrobiano.

2. *Actividad bactericida sérica en curvas de muerte bacteriana*⁹. De forma semejante a las curvas de muerte bacteriana con PMN descritas en los modelos *in vitro*, en este modelo se añade al cultivo de microorganismos el suero de voluntarios que han recibido una dosis del antimicrobiano, en vez de exponer éste directamente al antimicrobiano. Se valora de esta forma la reducción del inóculo en vez de establecer un título bactericida del suero, observándose hechos farmacodinámicos que tienen efecto en tiempos cortos (duración del ensayo de 2-4 h). Al mismo tiempo se puede estudiar si la acción de los PMN aumenta la muerte bacteriana en presencia del antimicrobiano, comparando la reducción del inóculo de curvas con suero de voluntarios más PMN y una curva con sólo células PMN y microorganismos.

Modelos in vivo. Como se ha comentado anteriormente, los modelos *in vivo* de predicción de eficacia mediante evaluaciones de la farmacodinamia de un antimicrobiano pueden estudiar diversos parámetros que actuarían como predictores de eficacia. Dado el elevado número de modelos en animales y teniendo en cuenta el posterior desarrollo de muchos de ellos en otros capítulos, se enumerarán a continuación los que permiten el estudio de un mayor número de microorganismos (más inespecíficos), debido al tipo de infección que se causa al animal.

1. *Modelo de sepsis intraperitoneal en ratones*^{7,10}. Este modelo se utiliza ampliamente como primera indicación de actividad *in vivo* de un compuesto. Su finalidad es cuantificar la supervivencia de ratones infectados intraperitonealmente con un inóculo alto y capaz de matar al animal en pocos días u horas. En principio se utiliza para determinar parámetros como la dosis efectiva que protege al 50 % de los ratones (DE_{50}). Sin embargo, en estadios más avanzados de es-

tudio de un antimicrobiano la dosificación se puede diseñar de forma que simule la de humanos y la determinación de las concentraciones del antimicrobiano en el suero permite una comparación de parámetros farmacocinéticos con porcentaje de supervivencia.

2. *Modelo de neumonía en ratones*¹¹. La finalidad es la misma que la del modelo anterior, y también se pueden utilizar un gran número de microorganismos capaces de producir infecciones en el pulmón o neumonías. En muchas ocasiones, los ratones son inmunodeprimidos mediante inyección de ciclofosfamida o irradiación, aumentando la capacidad invasiva del patógeno. Además de la supervivencia, se puede realizar también un recuento de bacterias en los pulmones de los animales a distintos tiempos.

3. *Modelo de infección en el muslo de ratón neutropénico*^{12,13}. Resulta técnicamente sencillo y poco complejo, y se puede utilizar en diversas determinaciones de parámetros farmacodinámicos, como se verá a continuación en otros apartados. En este modelo se causa una infección intramuscular en el muslo de ratones inmunodeprimidos; los animales son tratados con el antimicrobiano, y durante un período corto (8-16 h), se realizan recuentos de bacterias viables en el muslo homogeneizado de los ratones sacrificados cada hora o cada 2 h. Como en los anteriores, el diseño de los regímenes de dosificación (número de dosis, concentración, etc.) permite una correlación entre la eficacia (medida como reducción de unidades formadoras de colonias [UFC] en el muslo) y los distintos parámetros farmacocinéticos (determinados en el suero del ratón).

Modelos utilizados en la determinación de parámetros farmacodinámicos

Existen multitud de parámetros o variables de tipo farmacodinámico que determinan la actividad de los antimicrobianos. Muchos de ellos son específicos en cuanto a los microorganismos, y la mayoría están relacionados con el mecanismo de acción del compuesto frente a la bacteria. A continuación se describen brevemente los modelos experimentales que se han desarrollado para estudiar cada uno de ellos.

Efecto postantibiótico (EPA). Se ha definido el EPA como la supresión persistente del crecimiento bacteriano tras la exposición a una sustancia antimicrobiana. De esta forma, todos los modelos empleados en su estudio han "aprovechado" técnicas tanto *in vitro* como *in vivo* en las

que se "expone" el microorganismo al antimicrobiano, retirando éste después y cuantificando el crecimiento bacteriano en su ausencia.

Las técnicas más sencillas son las desarrolladas *in vitro*. Análogamente a las descritas en las curvas de muerte bacteriana, el microorganismo se expone a concentraciones constantes del antimicrobiano durante un tiempo corto (de 1 a 2 h) generalmente en caldo, procediéndose entonces a la retirada de éste. Para este procedimiento, se utilizan principalmente tres técnicas: *dilución*, *inactivación por enzimas* (sólo para betalactámicos) y *centrifugación*. Tras este proceso se realizan recuentos bacterianos para cuantificar el retraso en el crecimiento, comparándolo con cultivos control sin exposición previa al antimicrobiano¹⁴.

Sin embargo, el estudio *in vivo* de este parámetro permite una mejor aproximación a la realidad clínica. Para su estudio en animales se han empleado los siguientes modelos.

1. *Modelo de infección en el muslo de ratón neutropénico*^{12,13}. Descrito ya en el apartado anterior, es tal vez el más utilizado. Para estudiar el EPA, los ratones infectados son tratados con dosis bajas del antimicrobiano que aseguran una exposición corta del microorganismo. Al determinar las concentraciones del antimicrobiano en el suero, se puede calcular cuándo descienden de la CMI y, por tanto, el posible retraso en el crecimiento del inóculo.

2. *Modelo de meningitis en conejos*. Autores como Sande et al¹⁵ pusieron este modelo en práctica para estudiar el efecto de una sola dosis de ampicilina sobre *Streptococcus pneumoniae*.

3. *Modelo de endocarditis en ratas*. En este modelo, utilizado también por varios autores¹⁶, se produce una endocarditis en las válvulas aórtica o tricúspide. Un día más tarde se administra el antimicrobiano por vía intramuscular y posteriormente se determinan el número de UFC y la concentración del antimicrobiano en las vegetaciones producidas en las válvulas.

4. *Modelo de cámaras en conejos*. Este modelo es, tal vez, el menos utilizado¹⁷. Se utilizan cámaras de acero en forma de red (*tissue cage fluid*) que contienen un tampón (*buffer*) y que son implantadas 4 semanas antes del experimento en la espalda de conejos sanos. Tras establecerse un equilibrio entre los líquidos intersticiales y de la cámara, el día del experimento se introduce en la cámara el inóculo que previamente han sido expuesto a la acción de antimicrobiano *in vitro*.

5. *Modelo de piezas de algodón en ratones.* Renneberg y Walder¹⁸ han puesto a punto este modelo que, junto con el de infección en el muslo, son probablemente los mejor estandarizados. En vez de cámaras, se colocan piezas de algodón inoculadas bajo la piel de ratones.

En todos estos modelos, la determinación del EPA se realiza por recuento de UFC en el lugar de la infección, observando la diferencia entre animales controles y tratados. El principal problema está en distinguir el EPA del efecto de las concentraciones sub-CMI, siempre presentes tras un tratamiento.

Efecto de las concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento bacteriano. Las concentraciones subinhibitorias actúan de distinta manera sobre las bacterias en fase de crecimiento logarítmico, fase estacionaria o microorganismos previamente expuestos a la acción del antimicrobiano (fase de EPA)¹⁹.

Los modelos *in vitro* son los mismos que se han descrito para el EPA, con la diferencia de que tras la eliminación del antimicrobiano se añaden concentraciones subinhibitorias para observar su actividad sobre bacterias controles (ECS) o en fase de EPA (ECS-EPA).

En cuanto a los modelos en animales, se han utilizado también varios de los modelos descritos anteriormente para el estudio del EPA *in vivo* (infección en el muslo de ratón, neumonía, implante de piezas de algodón o cámaras en conejos). El posible efecto de estas concentraciones sub-CMI se observaría al inocular bacterias cuando las concentraciones de antimicrobiano han descendido de la CMI, y cuantificar su crecimiento.

Efectos sobre la morfología bacteriana. Los cambios en la morfología de las bacterias se han estudiado tanto con microscopio de luz como electrónico, ya que este segundo medio permite la observación de alteraciones en la ultraestructura de las células²⁰. Los modelos experimentales utilizados *in vitro* se pueden dividir en dos categorías: *estudios en medios líquidos o sobre superficies sólidas o semisólidas* (exposición a discos de antimicrobiano o colocación de membranas con microorganismos sobre placas de agar con concentraciones sub-CMI).

En cuanto a los modelos *in vivo*, el modelo más utilizado ha sido, por su sencillez y comodidad, el de infección intraperitoneal²¹. En este caso, el tratamiento debe ser corto, para permi-

tir una tasa de muerte bacteriana baja, recuperando el microorganismo del líquido peritoneal cuando las concentraciones del antimicrobiano en suero se encuentren por debajo de la CMI. Se pueden utilizar otros modelos, como el de meningitis en conejos anteriormente descrito, ya que permitiría una monitorización en el propio líquido cefalorraquídeo de las concentraciones del antimicrobiano.

Otros efectos farmacodinámicos sobre los microorganismos

1. *Efectos sobre la adherencia a superficies.* Algunos modelos permiten el estudio de la adherencia de microorganismos a diversas superficies tras ser tratados con antimicrobianos. En concreto, se han utilizado superficies como células epiteliales del tracto urinario y superficies plásticas²².

2. *Efectos sobre la producción de factores de virulencia.* Se ha observado la supresión por parte de eritromicina en concentraciones sub-CMI de la producción *in vitro* de exotoxina A, elastasa y fosforilasa de algunos microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*²³. Cepas con cápsula mucosa y no mucosa de esta misma especie han sido expuestas a la acción de concentraciones sub-CMI de aminoglucósidos, betalactámicos y ciprofloxacino, observándose en los primeros una reducción de la excreción de la cápsula de alginato y de sideróforos quelantes de acero.

3. *Efectos inmunomoduladores.* Dentro de este apartado se puede estudiar (con técnicas *ex vivo*) el efecto que los antimicrobianos inducen en los microorganismos y que influyen en las funciones de las células defensivas (PMN y macrófagos). En concreto, se pueden observar modificaciones tanto en la quimiotaxis como en la adherencia, fagocitosis o muerte intracelular mediante la preexposición de los microorganismos al antimicrobiano. También se han estudiado extensamente mediante estas técnicas el efecto postantibiótico leucocitario o la mayor susceptibilidad de las bacterias a ser fagocitadas cuando se encuentran en fase de EPA.

Ventajas y limitaciones

Todos los modelos experimentales expuestos anteriormente presentan una serie de ventajas e inconvenientes que condicionan su desarrollo. Por un lado, pueden señalarse diferencias inherentes a su naturaleza (estudios *in vitro* o *in vivo*) y posteriormwnte puede distinguirse entre los

TABLA III
PRINCIPALES VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS MODELOS *IN VITRO*, *EX VIVO* E *IN VIVO*

	In vitro	Ex vivo	In vivo
Ventajas	Comodidad Rapidez en la obtención de resultados Alta reproducibilidad Técnicas estandarizadas y aceptadas	Las mismas que <i>in vitro</i> Mayor aproximación a la realidad <i>in vivo</i> Capacidad de "cuantificar" la actividad (p. ej., títulos séricos) y compararla luego <i>in vivo</i>	Infecciones controladas y reproducibles Identificación rápida de falta de actividad <i>in vitro</i> Interacción de multitud de variables que influyen en la eficacia
Limitaciones	Sólo ofrecen indicaciones de actividad, y de forma generalizada Aún en simulaciones, ponen en juego pocas variables farmacodinámicas	Aunque más que <i>in vitro</i> , no responden a cuestiones específicas, sólo generales Más complejas que las <i>in vitro</i> por la necesidad de extraer células y/o fluidos humanos o animales	Laboriosidad y necesidad de instalaciones específicas Infecciones a menudo poco naturales (infecciones fulminantes y artificiales) Farmacocinética poco similar a la de humanos Modelos a veces poco estandarizados (en EPA, sub-CMI, morfología)

modelos que presentan un mejor ajuste a la realidad que se pretende conocer.

Estudios in vitro o in vivo

La principal ventaja de los estudios *in vitro* es, obviamente, su menor laboriosidad y su capacidad de obtener resultados más rápidamente y con una mayor reproducibilidad que los modelos *in vivo*. Sin embargo, estas técnicas *in vitro* sólo pueden ofrecer resultados de forma aproximada, ya que el número de variables que se tienen en cuenta son limitadas. Cabe destacar la mayor aproximación a la realidad *in vivo* mediante los sistemas de simulación farmacocinética, muy utilizados actualmente en detrimento de los modelos que emplean concentraciones "constantes" de antimicrobianos.

Un paso adelante lo componen sin duda los sistemas y modelos *ex vivo*, que medirían mediante técnicas *in vitro* los efectos de fluidos y/o células humanas (PMN o suero), y cuya principal ventaja es la capacidad de "cuantificar" la actividad de un antimicrobiano (p. ej., ofreciendo su título bactericida sérico). Tal vez la mayor ventaja de estos modelos es la superior estandarización de las técnicas que se utilizan, siendo ésta una de las desventajas de los modelos *in*

vivo, sobre todo de los que se emplean en la determinación de algunos parámetros farmacodinámicos.

Si bien los modelos *in vivo* tienen una mayor aproximación a la realidad clínica, es también cierto que deberían servir para responder a cuestiones específicas más que para dar una idea global de la actividad o eficacia de un antimicrobiano. Los modelos *in vivo* que estudian la predicción de eficacia son muy utilizados y la comparación de datos es fiable, pero otros, como los empleados en la determinación del EPA, no han sido lo suficientemente estandarizados como para que los datos puedan reflejar más diferencias significativas entre antimicrobianos que entre los propios modelos. Además, las diferencias entre la farmacocinética de animales y humanos debe ser tenida en cuenta a la hora de establecer comparaciones, ya que son en general muy diferentes¹. En la tabla III se resumen las principales ventajas y limitaciones en el uso de modelos tanto *in vitro* como *ex vivo* e *in vivo*.

Estudios de predicción de eficacia

Es en este campo en el que existe una mayor estandarización en cuanto a todos los modelos empleados, ya que se trata de técnicas utilizadas

habitualmente en el estudio de antimicrobianos y de amplia difusión. Todos ellos son imprescindibles en el estudio de antimicrobianos, ya que ofrecen una idea de la actividad de un producto. Por tanto, sus ventajas principales son su rapidez y el alto número de datos que se pueden obtener en poco tiempo. Sin embargo, estos estudios, como se apuntaba anteriormente, deben complementarse de forma inevitable con estudios más detallados en infecciones similares a las producidas en clínica humana.

Estudios de parámetros farmacodinámicos

El gran interés despertado hace unas décadas por el estudio de ciertos parámetros farmacodinámicos como el EPA contribuyó a que se desarrollaran un gran número de modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. De esta forma, los numerosos datos obtenidos sobre la mayoría de los antimicrobianos no permiten su comparación de forma significativa. El EPA de un antimicrobiano puede ser diferente en duración según el modelo utilizado¹⁴, existiendo notables diferencias entre los valores obtenidos *in vitro* e *in vivo* (más altos generalmente en este último caso). Los modelos *in vivo*, además, pueden subestimar los efectos de concentraciones subinhibitorias, que falsearían el EPA¹⁴ como se ha demostrado en alguna ocasión²⁴.

Como ejemplo de esta falta de estandarización o establecimiento de un protocolo unitario destaca que las fórmulas para determinar la duración de estos efectos suelen variar ampliamente de un modelo a otro, lo que ha llevado a la imposibilidad de comparación de resultados. Es en este grupo de modelos en los que sí puede aplicarse la característica de ser "indicadores" de parámetros clínicos, ya que ofrecen una idea aproximada de lo que se pretende cuantificar.

Aplicabilidad

Dado el elevado número de estudios realizados con los modelos expuestos anteriormente, en este apartado realizaremos un resumen del ámbito de aplicación de estos modelos y técnicas, resaltando principalmente la experiencia de los autores en este campo, con una sinopsis de lo que ha sido y es el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos.

En primer lugar, destaca la enorme importancia que tienen actualmente los datos de predicción de actividad en el estudio de la eficacia de un antimicrobiano. Todos los modelos de estudio en este apartado conducen al establecimiento de

patrones de actividad frente a los microorganismos. Para la determinación de estos patrones, se siguen habitualmente una secuencia de tipo lógico en los ensayos a realizar¹:

1. Demostración *in vitro* de la disminución de masa bacteriana (o inóculo inicial) mediante curvas de muerte (preferentemente en simulaciones farmacocinéticas).
2. Demostración *ex vivo* y/o *in vivo* de esta capacidad *in vitro* mediante los modelos de supervivencia enumerados en apartados anteriores.
3. Posible extrapolación a humanos.

Como ejemplo pueden citarse los estudios realizados para explicar la eficacia de las penicilinas (en concreto de amoxicilina) sobre cepas de *S. pneumoniae*, aun cuando la tasa de resistencia de este microorganismo a betalactámicos es cada vez más preocupante. Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha podido determinar la eficacia de amoxicilina incluso con una cepa de neumococo resistente a penicilina, utilizando para ello la mayoría de los modelos tanto *in vitro* como *in vivo* que ya hemos descrito. En otros casos se puede establecer una relación entre la observación de uno o más parámetros farmacodinámicos y su capacidad para influir en la actividad de un compuesto. De esta forma, en otros estudios hemos empleado modelos como el de lesión en el muslo de ratón neutropénico para comprobar si la duración del EPA podía influir en los regímenes de dosificación de varios antimicrobianos^{25,26}, observándose que en compuestos con EPA no significativo (como algunos betalactámicos) los regímenes con dosificaciones más espaciadas eran poco eficaces en relación con antimicrobianos que sí tenían EPA (macrólidos o quinolonas).

A este respecto, debe citarse como aplicación realmente interesante los trabajos de Vogelmann et al con este mismo modelo *in vivo*, en el que correlacionaron parámetros farmacocinéticos con la eficacia de varios compuestos de distintas clases de antimicrobianos¹³. Frente a varios microorganismos y utilizando varias dosificaciones distintas, se establecieron correlaciones entre el tiempo sobre CMI o CMB, ABC, etc., con los recuentos de bacterias en el muslo de los ratones, estableciendo indicadores de eficacia con los que poder ayudar en el diseño de regímenes de dosificación en humanos. De forma similar, se han realizado estudios con otros modelos como el de neumonía en ratones, relacionando farmacocinética y eficacia en recuentos de UFC en el pulmón¹¹.

Entrando en el campo del estudio de parámetros farmacodinámicos, se han aplicado los modelos descritos a un gran número de antimicrobianos. Existen amplias revisiones de los valores tanto de EPA como de otros efectos relacionados (concentraciones subinhibitorias o morfología) con modelos tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁴, si bien estos trabajos se llevan a cabo actualmente de forma rutinaria en la mayoría de nuevos antimicrobianos y su trascendencia parece haber disminuido. También hay que destacar el elevado número de trabajos en los que se comparan las distintas técnicas o modelos (sobre todo *in vitro*) que se utilizan en este tipo de ensayos²⁷.

Teniendo en cuenta todos ellos, se han establecido "patrones" de comportamiento de las combinaciones antimicrobiano-microorganismo en relación con estos parámetros. De nuestra experiencia, al igual que de la de otros muchos investigadores, se ha establecido que existen ciertos grupos de antimicrobianos que carecen de EPA o éste es poco significativo (betalactámicos con grampositivos), mientras que otras clases como los macrólidos, aminoglucósidos o quinolonas poseen unos valores altos frente a la mayoría de los microorganismos ensayados, tanto *in vitro* como *in vivo*^{14,25,26}.

El mismo comportamiento se puede seguir en la valoración de parámetros como el efecto de las sub-CMI sobre el crecimiento o la morfología bacteriana. Parece existir una relación entre la duración del EPA y la de los efectos de las concentraciones sub-CMI; antimicrobianos como los macrólidos o quinolonas parecen impedir el crecimiento de las bacterias hasta en 24 h, mientras que en betalactámicos este efecto (aunque también significativo), es más reducido¹⁹. Por contra, los efectos de estos últimos sobre la morfología bacteriana son más variados, tal vez a causa del mecanismo de acción, más relacionado con la forma de las células que en los macrólidos o quinolonas. En cuanto a la inmunomodulación, se ha observado que tanto los betalactámicos (amoxicilina, cefotaxima, etc.) como las fluorquinolonas y los macrólidos parecen inducir un incremento de la funciones de PMN (actividad bactericida o fagocitosis)^{9,28}.

Conclusiones

Como conclusiones destaca que la utilidad de los modelos *in vitro* e *in vivo* en el estudio de la farmacodinamia ha llevado en las últimas décadas a la obtención de un altísimo número de resultados que engloban a la práctica totalidad de

los antimicrobianos de interés general. Si bien algunas técnicas y modelos necesitarían un mayor consenso para su estandarización, la realidad es que todos los resultados que se obtengan tendrán, sin duda, un gran valor en el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos. Desde los estudios *in vitro*, necesarios para tener un estimación del comportamiento de un compuesto, hasta los modelos *in vivo* que ofrecen un dato más aproximado de lo que puede ocurrir en la clínica humana, todos han demostrado presentar, en general, una adecuada correlación con los datos obtenidos de ensayos clínicos y de la experiencia clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zak O, O'Reilly T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1.527-1.531.
2. Aguilar L, Giménez MJ, Dal-Ré R. Una aproximación explicativa de la eficacia terapéutica de las penicilinas frente a *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Esp Quimioterap* 1996; 9: 260-265.
3. Martín M, Gómez-Lus ML, Aguilar L, Martínez P, Giménez MJ, Prieto J. Effect of clavulanic acid and/or polymorphonuclear neutrophils on amoxicillin bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 512-516.
4. Thorburn CE, Knott S, Edwards DI. *In vitro* activities of oral β -lactams at concentrations achieved in humans against penicillin-susceptible and -resistant pneumococci and potential to select resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1.973-1.979.
5. Balcabao IP, Aguilar L, Martín M, García Y, Dal-Ré R, Prieto J. Activities against *Streptococcus pneumoniae* of amoxicillin and cefotaxime at physiological concentrations: *in vitro* pharmacodynamic simulation. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2.904-2.906.
6. Fenoll A, Jado I, Casal J, Giménez MJ, Aguilar L. Comparative *in vitro* pharmacodynamic simulation with amoxicillin and cefotaxime physiological concentrations against 10 penicillin-resistant (PRP) and 10 penicillin-susceptible (PSP) *Streptococcus pneumoniae* strains [resumen M-297]. Hamburgo: Program and Abstracts of the 2nd European Congress of Chemotherapy, 1998.
7. Pérez-Trallero E, Alkorta M, García-Arenzana JM, Iturzaeta A, Gomariz M. *In vitro*, *in vivo* and *ex vivo* studies with oral β -lactams against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 629-634.
8. Pérez-Trallero E, Alkorta M, Montes M, Gutiérrez C, García-Arenzana JM. *Ex vivo* study of serum bactericidal titers of oral cephalosporins compared with those of amoxicillin against *Streptococcus pneumoniae* sensitive and resistant to penicillin [resumen C17]. Washington DC: Program and Abstracts

- of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, 1995; 42.
9. Gómez-Lus ML, Giménez MJ, Prieto J, Martín M, Frías J, Aguilar L. Effect of polymorphonuclear neutrophils on serum bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* after amoxicillin administration. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 40-43.
 10. Pérez-Trallero E, Alkorta M, Gil A, Vicente D, Part C. Comparison of activity of amoxicillin with that of oral cephalosporins against *Streptococcus pneumoniae* using a mouse protection model [resumen C16]. p. 42. Washington DC: Program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, 1995; 42.
 11. Soriano F, Ponte C, Nieto E, Parra A. Correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetic parameters with *in vivo* effect of amoxicillin, co-amoxiclav and cefotaxime in a murine model of pneumococcal pneumonia. J Antimicrob Chemother 1996; 38: 227-236.
 12. Vogelman B, Gudmundsson S, Turnidge J. *In vivo* postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. J Infect Dis 1988; 157: 287-298.
 13. Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. J Infect Dis 1988; 158: 831-847.
 14. Craig WA, Gudmundsson S. The postantibiotic effect. En: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine (4^a ed.). Baltimore: Williams and Wilkins, 1996; 296-329.
 15. Sande WA, Korzeniowski OM, Allegro GM, Brennan RO, Zak O, Scheld WM. Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *S. pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect *in vivo*. Rev Infec Dis 1981; 3: 98-109.
 16. Hessen MT, Pitsakis PG, Levison ME. Absence of a postantibiotic effect in experimental left-sided *Streptococcus faecalis* endocarditis treated with penicillin plus gentamicin. En: Gillissen G, Opferkuch W, Peters G, Pulverer G, editores. The influence of antibiotics on the host-parasite III. Berlín-Heidelberg: Springer-Verlag, 1989; 222-225.
 17. Cars O, Ogren S. A microtechnique for the determination of antibiotics in muscle. J Antimicrob Chemother 1981; 8: 39-48.
 18. Renneberg J, Walder M. A mouse model for simultaneous pharmacokinetics and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. J Antimicrob Chemother 1988; 22: 51-60.
 19. Odenholt-Tornqvist I. Studies of the postantibiotic effect and the postantibiotic sub-MIC effect of meropenem. J Antimicrob Chemother 1993; 31: 881-892.
 20. Lorian V, Gemmell CG. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses. En: Lorian V editor. Antibiotics in laboratory medicine (4^a ed.). Baltimore: Williams and Wilkins, 1996; 397-452.
 21. Fuentes F, Anta L, Izquierdo J, Gómez-Lus ML, Prieto J. Comparación del efecto *in vitro* e *in vivo* de meropenem y ciprofloxacino sobre la morfología de *E. coli* y *S. aureus*. Rev Esp Quimioterap 1998; 11: 238-244.
 22. Zhanel GG, Kim SO, Davidson RJ, Hoban DJ, Nicolelle LE. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin and gentamicin on the adherence of *P. aeruginosa* to Vero cells and voided uroepithelial cells. Chemotherapy 1993; 39: 105-111.
 23. Hirahata Y, Kaku M, Mizukane R, Ishida K, Nobuhiko N, Matsumoto T et al. Potential effects of erythromycin on host defense systems and virulence of *P. aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1.922-1.927.
 24. Oshida T, Onta T, Nakanishi N, Matsushita T, Yamaguchi T. Activity of sub-minimal inhibitory concentrations of aspoxicillin in prolonging the postantibiotic effect against *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1990; 26: 29-38.
 25. Fuentes F, Izquierdo J, Martín M, Gómez-Lus ML, Prieto J. Postantibiotic and sub-MIC effects of azithromycin and isepamicin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 414-418.
 26. Fuentes F, Martín MM, Izquierdo J, Gomez-Lus ML, Prieto J. *In vivo* and *in vitro* study of several pharmacodynamic effects of meropenem. Scand J Infect Dis 1995; 27: 469-474.
 27. MacKenzie FM, Gould IM. The postantibiotic effect. J Antimicrob Chemother 1993; 32: 519-537.
 28. Cándido A. Antibióticos y mecanismos de defensa. En: Eficacia *in vivo*. Eficacia *in vitro*. Madrid: Ediciones Doyma S.A., 1997; 51-60.

DISCUSIÓN

J. PASCUAL: Una de las limitaciones de los estudios *in vitro* es que la mayoría de los métodos que se han explicado se hacen en un medio acelular, es decir, se hacen con un medio de cultivo artificial y obviamente la situación *in vivo* es muy distinta. Me gustaría reclamar la importancia que en nuestra opinión tiene un parámetro farmacológico que sería estudiar la concentración intracelular de los antibióticos y su correlación

con la actividad intracelular. Es decir, creo que es un parámetro importante no sólo en aquellos casos en los que hablamos de microorganismos que sean patógenos intracelulares estrictos sino que la mayoría de las bacterias en un momento determinado de la patogenia de la enfermedad van a tener un comportamiento intracelular o van a tener una multiplicación intracelular. En ese sentido, creo que es un parámetro que, con

vistas a modelos experimentales, puede aportar una información importante.

F. FUENTES: Los parámetros farmacodinámicos están bastante relacionados con la farmacocinética. En todos los modelos que he revisado, tal vez un poco rápido, la farmacocinética debe estar bastante controlada. Es importante saber

los valores que se van a alcanzar para posteriormente poder compararlos con otros resultados de efectos postantibióticos en otros modelos, incluso en el mismo con otras concentraciones más altas. Hay una relación importante entre los modelos de farmacocinética y farmacodinámica.