

TOXICIDAD RETINIANA DE DOXICICLINA INTRAVÍTREA. ESTUDIO PILOTO

INTRAVITREAL TOXICITY OF DOXYCYCLINE. A PILOT STUDY

AYDIN E¹, KAZI AA², PEYMAN GA², ESFAHANI MR², MUÑOZ-MORALES A², KIVILCIM M², CARO-MAGDALENO M³

RESUMEN

Objetivo: Valorar la toxicidad retiniana de la doxiciclina administrada en inyecciones intravítreas.

Método: Utilizamos catorce conejos albinos neozelandeses que dividimos en 5 grupos. Inyectamos en dos ojos cada una de las siguientes concentraciones de doxiciclina: 2.000 µg/0,1 ml; 500 µg/0,1 ml; 250 µg/0,1 ml; 125 µg/0,1 ml y 67,5 µg/0,1 ml. Dos ojos, usados como control, recibieron 0,1 ml de solución de dextrosa al 5%. Examinamos a todos los animales antes y después de la inyección con oftalmoscopia indirecta y biomicroscopia. Realizamos electroretinogramas en todos antes de la inyección intravítrea y dos semanas después; y posteriormente los animales fueron eutanizados. Se enuclearon los ojos y se prepararon para estudio histológico.

Resultados: Los grupos que mostraron una disminución significativa en los electroretinogramas fueron los inyectados con las siguientes concentraciones de doxiciclina: 2.000 µg/0,1 ml; 500 µg/0,1 ml y 250 µg/0,1 ml. No se observaron cambios significativos en los electroretinogramas de los inyectados con 125 y 67,5 µg/0,1 ml. No hubo signos de toxicidad retiniana en los exámenes de biomicroscopia, en oftalmoscopia indirecta e histología de los

ABSTRACT

Objective: To assess the retinal toxicity of varying concentrations of intravitreally administered doxycycline, a member of tetracycline family.

Methods: Fourteen New Zealand albino rabbits, divided into 5 groups, were used for this study. The initial concentration of doxycycline (100 mg) was titrated using 5% dextrose solution to the following concentrations in a volume of 0.1 ml: 2000 µg, 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, and 62.5 µg. Each concentration was injected into 2 rabbit eyes. Two control eyes received 0.1 ml of 5% dextrose solution. All animals were examined before and after injection using indirect ophthalmoscopy and slit-lamp biomicroscopy. Electroretinography (ERG) was performed on all animals prior to the intravitreal injection and 2 weeks post-injection. The animals were re-examined at this time by indirect ophthalmoscopy and slit-lamp biomicroscopy and were then subjected to euthanasia. Their eyes were enucleated and examined using light microscopy.

Results: The doxycycline injected group exhibited significant decreases in ERG of the eyes injected with 2000 µg, 1000 µg, 500 µg, and 250 µg/0.1 ml. No significant changes in the ERG were observed

Recibido: 24/5/05. Aceptado: 8/3/07.

University of Arizona. Department of Ophthalmology. Tucson. Arizona. United States of America.

¹ Licenciado en Medicina. Department of Ophthalmology, Tulane University Health Sciences Center. New Orleans. USA. Department of Ophthalmology and Gaziosmanpasa University. Tokat. Turkey.

² Licenciado en Medicina. Department of Ophthalmology, Tulane University Health Sciences Center. New Orleans. USA.

³ Licenciado en Medicina. HHUU Virgen del Rocío. Sevilla. España.

Correspondencia:

Gholam A. Peyman
1501 N Campbell Ave
Tucson AZ USA
85724-5220

E-mail: ccole@eyes.arizona.edu

inyectados con 125 µg/0,1 ml o niveles menores de doxiciclina.

Conclusión: Las inyecciones intravítreas de doxiciclina parecen seguras en un rango igual o menor a 125 µg/0,1 ml en el conejo albino. La doxiciclina intravítrea podría ser una alternativa barata y beneficiosa para el tratamiento de la endoftalmitis, especialmente frente a los *Staphylococcus aureus* resistentes.

Palabras clave: Endoftalmitis, doxiciclina, inyección intravítrea, toxicidad retiniana.

following the injection of lesser concentration levels. There were no signs of retinal toxicity on slit-lamp examination, indirect ophthalmoscopy, or light microscopy in all the eyes injected with doxycycline concentrations of 125 µg or lower.

Conclusions: Doxycycline injected intravitreally appeared safe at concentrations of 125 µg/0.1 ml or less in albino rabbits. Intravitreal doxycycline may be beneficial, and is an inexpensive alternative drug which could be used in the treatment of bacterial endophthalmitis particularly against resistant *Staphylococcus aureus* organisms (*Arch Soc Esp Ophthalmol* 2007; 82: 223-228).

Key words: Doxycycline, endophthalmitis, intravitreal injection, retinal toxicity.

INTRODUCCIÓN

La endoftalmitis es un grave proceso infeccioso-inflamatorio que se produce por la inoculación traumática o iatrogénica de agentes infecciosos. La incidencia total de endoftalmitis tras cirugía de cataratas en los Estados Unidos es aproximadamente del 0,1% (1). A pesar de los avances en cirugía y tratamientos, esta devastadora complicación postoperatoria causa pérdida severa de agudeza visual en un 30% de los casos (2) y ceguera en el 18% (3). Sin embargo, con un diagnóstico y tratamiento precoz podemos conseguir resultados visuales satisfactorios.

En años recientes, las inyecciones intravítreas de antibióticos han demostrado ser el modo más efectivo de mantener niveles adecuados de tratamiento intraocular (4,5). Los más usados en inyección intravítrea en la endoftalmitis son la vancomicina, la amikacina y la ceftazidima.

La vancomicina se considera el tratamiento de primera elección para cubrir las endoftalmitis por grampositivos (GP) (6). Los aminoglucósidos y la ceftazidima son antibióticos de amplio espectro con actividad antibacteriana sobre los organismos gramnegativos (GN). Además los aminoglucósidos presentan un efecto sinérgico cuando se asocian a vancomicina contra los cocos GP (5,7). Para cubrir un gran espectro de microorganismos se combina usualmente la vancomicina con ceftazidima o con amikacina, pero hay evidencia de un aumento de resistencia a estos agentes (8). De hecho, ha sido demostrada la resistencia de *Streptococcus viridans*

a las tetraciclinas, siendo sensibles a la vancomicina y cloranfenicol (9).

La doxiciclina, una tetraciclina de amplio espectro, ha sido usada con éxito en el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) y en otras infecciones respiratorias, genitourinarias, ginecológicas y oculares (10-13). A la luz de estos hallazgos, pensamos que la doxiciclina podría ser un tratamiento alternativo a la vancomicina gracias a su baja concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a los cocos GP.

A pesar del conocimiento de este antibiótico en tratamiento oral o parenteral, no hay estudios sobre su uso o toxicidad intravítrea. Llevamos a cabo este estudio para evaluar la toxicidad ocular de las inyecciones intravítreas de doxiciclina.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO

Animales

Se emplearon catorce conejos albinos neozelandeses de 2 a 3 kg de peso. Los animales fueron tratados según el acuerdo de la *Association of Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO). Realizamos biomicroscopía (BMC) y oftalmoscopía indirecta (OI) antes de iniciar el estudio, después de la inyección intravítrea y antes de sacrificar a los animales. Todos aquellos que presentaron opacidad de medios o lesiones retinianas se excluyeron del estudio.

Inyecciones intravítreas

Los conejos fueron anestesiados antes de todos los procedimientos usando 1 ml de una mezcla de ketamina (50 µg/kg) y xylacina (5 µg/kg) intramuscular. Se dilataron sus pupilas con solución oftálmica de fenilefrina al 2,5% (Colircusí Fenilefrina®. Alcon Cusí, SA. El Masnou. Barcelona. España) y tropicamida al 0,5% (Colircusí Tropicamida®. Alcon Cusí, SA. El Masnou. Barcelona. España). Se aplicó proparacaína al 0,5% (ANESALCONMR; Alcon Laboratorios Argentina, S. A.; Buenos Aires; Argentina) como anestesia tópica.

Los procedimientos se realizaron bajo condiciones de esterilidad usando un microscopio quirúrgico. Se realizó una incisión en cámara anterior con aguja de 25 G para evacuar 0,1 cc de humor acuoso, reduciendo así la presión intraocular (PIO) y evitando, por otro lado, el reflujo del antibiótico tras la inyección.

Se inyectó una dosis de doxiciclina con aguja de 30 G a 2 mm del limbo esclerocorneal. Dividimos a los conejos en 6 grupos. Se inyectaron dos ojos derechos de cada grupo con una de las siguientes concentraciones de doxiciclina diluida desde una concentración inicial de 100 µg con dextrosa al 5%: 2.000 µg/0,1 ml; 1000 µg/0,1 ml; 500 µg/0,1 ml; 250 µg/0,1 ml; 125 µg/0,1 ml y 67,5 µg/0,1 ml. Dos ojos usados como controles recibieron 0,1 ml de dextrosa al 5%.

Test electrofisiológico

Se realizaron electroretinograma (ERG) usando el sistema UTAS-2000 (LKC Technology; Gaitersburg; USA) y el protocolo estandar de ERG antes de la inyección intravítrea y 2 semanas después de la misma. Los conejos fueron adaptados a la oscuridad durante 30 minutos tras dilatación pupilar. Se colocaron lentes de contacto unipolares (electrodos del ERG) en cada córnea utilizando goniosol (IOLab Corporation; Claremont, CA.; USA); el electrodo negativo se colocó en el espacio subcutáneo frontal, y el electrodo de tierra se colocó en la oreja con gel. Se recogió la respuesta escotópica de adaptación a la oscuridad (paso 1), la respuesta escotópica de flash (paso 2) y la respuesta fotópica de adaptación a la luz (paso 3). Para cada paso se determinó la media de 5 curvas. Se calculó la diferencia entre las ondas a y b para cada paso. Se

comparó el ERG de base (antes de la inyección intravítrea) con el final (dos semanas tras la inyección). Se consideraron significativos los descensos en la respuesta de más del 30%. En los grupos tratados con concentraciones menores de doxiciclina se encontró un descenso menor del 30%, y por lo tanto, no significativo.

Examen histológico

Tras la sesión de ERG final, todos los conejos fueron sacrificados con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico. Los ojos fueron enucleados y fijados en karnovsky durante 48 horas y luego procesados y teñidos con hematoxilina-eosina para estudio histológico.

RESULTADOS

Examen clínico

Se realizó OI en todos los ojos tras la inyección intravítrea y justo antes de la eutanasia. No se encontró opacidad de medios, hemorragia vítrea, desprendimiento de retina o atrofia del nervio óptico en ninguno de los ojos que se inyectaron dosis inferiores a 1.000 µg/0,1 ml. Con dosis de 1.000 µg/0,1 ml y de 2.000 µg/0,1 ml se encontraron restos de droga cristalizada en el vítreo.

Test electrofisiológico

Se consideraron significativos los descensos en amplitud entre los ERG de base y finales mayores del 30%. Los ERG de los grupos tratados con 2.000 µg/0,1 ml; 1.000 µg/0,1 ml; 500 µg/0,1 ml y 250 µg/0,1 ml de doxiciclina presentaron un descenso significativo en las amplitudes de la onda A y B (fig. 1).

Examen histológico

Se realizó histología en todos los ojos tratados con doxiciclina. Se encontraron evidencias de toxicidad retiniana en los ojos inyectados con 250 µg/0,1 ml y con concentraciones superiores de doxiciclina (fig. 2). No se encontraron alteraciones

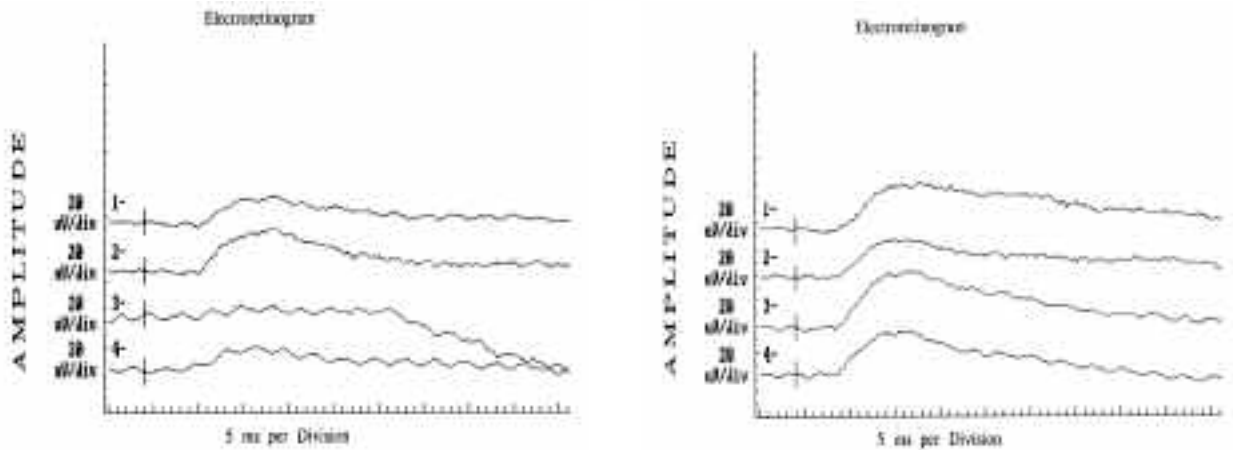


Fig. 1: A. ERG inicial (1 y 2) y tras 2 semanas de la inyección intravítrea (3 y 4) de dos ojos que recibieron 250 µg/0,1 ml de doxiciclina. El ERG final muestra descenso en la amplitud como evidencia de toxicidad retiniana. B. ERG inicial (1 y 2) y final (3 y 4) de dos ojos que recibieron 125 µg/0,1 ml de doxiciclina, no encontramos descenso significativo en la amplitud.

en ninguno de los ojos inyectados con concentraciones de 125 µg/0,1 ml o menores.

DISCUSIÓN

El antibiótico con la menor CMI sobre un grupo bacteriano es el más potente. Se requieren bajas CMI y altas concentraciones del antibiótico en los tejidos para una terapia efectiva y que no produzca resistencias. Se considera que un tratamiento efectivo de la endoftalmítis requiere al menos dos a 10 veces de la CMI-90 para el microorganismo causal (13).

Se observó toxicidad retiniana en los ojos que fueron inyectados con 250 µg/0,1 ml y concentraciones superiores de doxiciclina (fig. 2). Sin embargo, no se encontraron evidencias de toxicidad en ninguno de los ojos que fueron inyectados con concentraciones de 125 µg/0,1 ml o menores.

Las fluoroquinolonas están siendo usadas ampliamente como tratamiento intravítrea en las endoftalmítis. Presentan un gran espectro de acción cubriendo la mayoría de grampositivos y gramnegativos.

Las fluorquinolonas de cuarta generación (gatifloxacino y moxifloxacino) han mejorado su espectro de acción sobre grampositivos respecto a las fluorquinolonas de segunda generación (14). Por otra parte, nosotros mostramos alteraciones en el ERG a concentraciones de 320 µg/0,1 mL y en el examen clínico con concentraciones superiores a 160 µg/0,1 mL (15).

Actualmente, la inyección de antibióticos intravítrea se considera el manejo estándar de la endoftalmítis (16,17). También se ha documentado aumento en la incidencia de los *Staphylococcus aureus* (EA) meticilin-resistentes (18,19).

El aumento en la resistencia de los microorganismos GP a la meticilina y a las fluoroquinolonas de primera y segunda generación, así como el riesgo de toxicidad de los aminoglucósidos usados a altas dosis, ha llevado a los investigadores a evaluar nuevos antibióticos. Por todo esto, muchos médicos han convertido a la vancomicina en la única cara alternativa para cubrir a los GP. La doxiciclina ha sido usada con gran éxito en el tratamiento de infecciones severas (10-12) pero aun no se había evaluado su toxicidad intraocular hasta la realización de nuestro estudio.

La doxiciclina tiene gran potencia, amplio espectro de acción, larga vida media y gran biodisponibilidad en comparación con macrólidos, cefalosporinas y trimetropin-sulfametoxazol.

La combinación de tigeciclina y gentamicina aumenta la actividad contra los enterococos y EA vancomicina-resistentes (20). Aldridge KE et al. (21) demostraron que la doxiciclina y el norfloxacino son unos antibióticos tan activos contra los EA meticilin resistentes como la vancomicina. La doxiciclina ha demostrado buena actividad contra la mayoría de las cepas de estafilococos meticilin resistentes (EA y *Estafilococos coagulasa* negativos, incluyendo *S. Epidermis*) testados, con 100

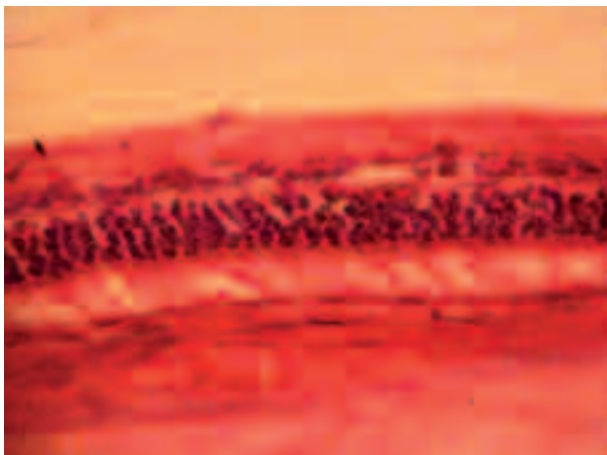
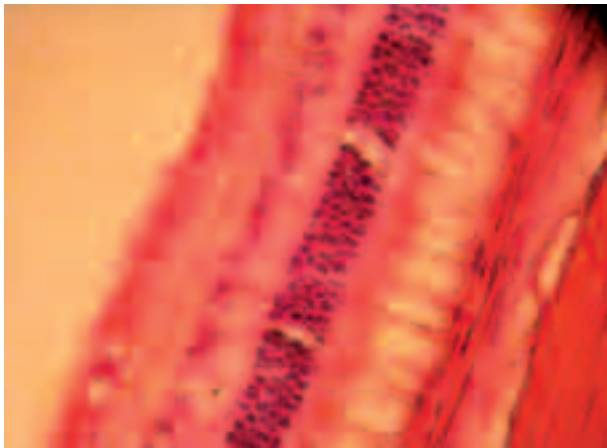
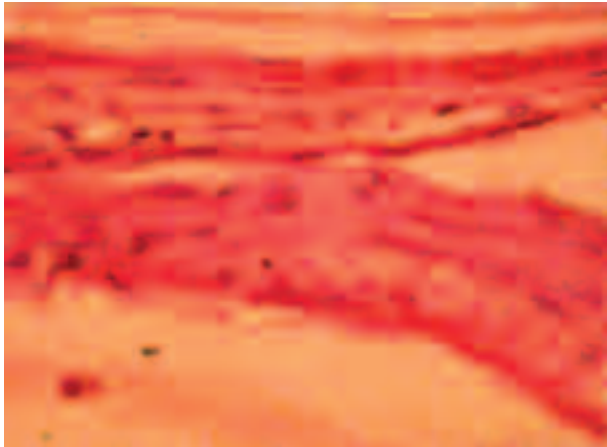


Fig. 2: Cortes histológicos de retina teñida con hematoxilina-eosina y visualizada a 400 aumentos de conejos de los grupos inyectados con A. 250 $\mu\text{g}/0,1$ ml B. 125 $\mu\text{g}/0,1$ ml y C. 67,5 $\mu\text{g}/0,1$ ml de doxiciclina. Encontramos que todas las capas de la retina neurosensorial se encuentran intactas y no hay signos de toxicidad salvo para el grupo tratado con 250 $\mu\text{g}/0,1$ ml de dosis.

cepas inhibidas por 2 $\mu\text{g}/0,1$ del antibiótico. La CMI de *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, y *Moraxella catarrhalis* fue menor de 2 $\mu\text{g}/0,1$ ml (22,23). Los resultados de los tests de CMI en los rangos propuestos de control de calidad (QC) en el uso de la doxiciclina para *S. pneumoniae*, SA y *E. faecalis* fueron 0,016-0,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,12-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; y 2-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente (24).

Por otra parte, se ha demostrado el efecto hipotensor de las tetraciclinas tras inyección intravítrea en conejos por lo que esto podría mermar su campo de aplicación. Este efecto aparece días después pero se mantiene durante un tiempo prolongado siendo la disminución de la presión intraocular de hasta 12 mmHg en algunos casos (25).

Asumiendo que el volumen de humor vítreo en el conejo es de 1,5 ml (26) y que se produce una distribución ecuánime de la droga tras la inyección intravítrea, las concentraciones de 67,5 y 125 $\mu\text{g}/0,1$ ml de doxiciclina en el vítreo se estimaron como 42 y 78 $\mu\text{g}/0,1$ ml respectivamente. Incluso la mínima dosis administrada excede la dosis efectiva necesaria de la droga para inhibir las cepas resistentes de GP (EA y Estafilococos coagulasa negactivos, incluyendo S.Epidermis) y los GN.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que las inyecciones intravítreas de doxiciclina en una concentración de 125 $\mu\text{g}/0,1$ ml o menores son seguras en el conejo albino. La doxiciclina intravítrea puede ser una alternativa a la vancomicina barata y beneficiosa en el tratamiento de la endoftalmitis bacteriana, con un amplio espectro de acción y una baja tasa de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Javitt JC, Street DA, Tielsch JM, Wang Q, Kolb MM, Schien O, et al. National outcomes of cataract extraction. Retinal detachment and endophthalmitis after outpatient cataract surgery. *Cataract Patient Outcomes Research Team. Ophthalmology* 1994; 101: 100-106.
2. Montan PG, Koranyi G, Setterquist HE, Stridh A, Philipson BT, Wiklund K. Endophthalmitis after cataract surgery: risk factors relating to technique and events of the operation and patient history: a retrospective case-control study. *Ophthalmology* 1998; 105: 2171-2177.
3. Yamada M, Mochizuki H, Yamada K, Kawai M, Mashima Y. Aqueous humor levels of topically applied levofloxacin in human eyes. *Curr Eye Res* 2002; 24: 403-406.
4. Peyman GA. Antibiotic administration in the treatment of bacterial endophthalmitis. II. Intravitreal injections. *Surv Ophthalmol* 1977; 21: 339-346.
5. Flynn HW Jr, Pulido JS, Pflugfelder SC, Davis JL, Culbertson WW, Roussel TJ, et al. Endophthalmitis therapy:

- changing antibiotic sensitivity patterns and current therapeutic recommendations. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 175-176.
6. Thomas T, Galiani D, Brod RD. Gentamicin and other antibiotic toxicity. *Ophthalmol Clin North Am* 2001; 14: 611-624.
 7. Homer P, Peyman GA, Koziol J, Sanders D. Intravitreal injection of vancomycin in experimental staphylococcal endophthalmitis. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1975; 53: 311-320.
 8. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670-1673.
 9. Sepala H, Al-Juhaish M, Jarvinen H, Laitinen R, Huovinen P. Effect of prophylactic antibiotics on antimicrobial resistance of viridans streptococci in the normal flora of cataract surgery patients. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 307-315.
 10. Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Doxycycline use for community-acquired pneumonia: contemporary in vitro spectrum of activity against *Streptococcus pneumoniae* (1999-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 147-149.
 11. Forslin L, Danielson D, Kjellander J, Falk V. Antibiotic treatment of acute salpingitis. A study of plasma concentrations of two tetracyclines (doxycycline and lymecycline). *Acta Obstet Gynecol Scand* 1982; 61: 59-64.
 12. Nakata K, Maeda H, Fujii A, Arakawa S, Umezu K, Kamidono S. In vitro and in vivo activities of sparfloxacin, other quinolones, and tetracyclines against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 188-190.
 13. O'Brien TP, Maguire MG, Fink NE, Alfonso E, McDonnell P. Efficacy of ofloxacin vs ceftazolin and tobramycin in the therapy for bacterial keratitis. Report from the Bacterial Keratitis Study Research Group. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 1257-1265.
 14. Smith A, Pennefather PM, Kaye SB, Hart CA. Fluoroquinolones: place in ocular therapy. *Drugs* 2001; 61: 747-761.
 15. Aydin E, Kazi AA, Peyman GA, Esfahani MR. Intravitreal toxicity of moxifloxacin. *Retina* 2006; 26: 187-190.
 16. Kowalski RP, Karenchak LM, Gordon YJ. Comparison of ciprofloxacin and ofloxacin using human corneal susceptibility levels. *Cornea* 1998; 17: 282-287.
 17. O'Day DM, Jones DB, Patrinely J, Elliott JH. *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis. Visual outcome following noninvasive therapy. *Ophthalmology* 1982; 89: 354-360.
 18. Crossley K, Loesch D, Landesman B, Mead K, Chern M, Strate R. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. I. Clinical studies. *J Infect Dis* 1979; 139: 273-279.
 19. Peacock JE Jr, Marsik FJ, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction and spread within a hospital. *Ann Intern Med* 1980; 93: 526-532.
 20. Mercier RC, Kennedy C, Meadows C. Antimicrobial activity of tigecycline (GAR-936) against *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* used alone and in combination. *Pharmacotherapy* 2002; 22: 1517-1523.
 21. Aldridge KE, Janney A, Sanders CV. Comparison of the activities of coumermycin, ciprofloxacin, teicoplanin, and other non-beta-lactam antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from various geographical locations. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 634-638.
 22. Cunha BA. Doxycycline for community-acquired pneumonia [letter]. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 870.
 23. Cunha BA, Domenico P, Cunha CB. Pharmacodynamics of doxycycline. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 270-273.
 24. Ross JE, Jones RN. Quality Control Working Group. MIC quality control guidelines for doxycycline when testing gram-positive control strains by the reference methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 295-297.
 25. Wallace I, Krupin T, Stone RA, Moolchandani J. The ocular hypotensive effects of demeclocycline, tetracycline and other tetracycline derivatives. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1594-1598.
 26. Tano Y, Sugita G, Abrams G, Machemer R. Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids. *Am J Ophthalmol* 1980; 89: 131-136.