

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**TOXICIDAD AGUDA DE RICOBENDAZOLE EN RATAS A DIFERENTES
VÍAS DE ADMINISTRACIÓN**

Por

**BARRIOS ALVAREZ, Christian Emanuel
HERNÁNDEZ CASTELLANI, Mauricio Germán**

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Carmen García y Santos

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Alicia Dib Brusales

Tercer miembro:

Dra. Gimena Feijóo Chácharo

Cuarto miembro (Co-Tutor):

Dr. Gonzalo Suárez Veirano

Fecha:

27/03/2019

Autores:

Br. Christian Barrios Alvarez

Br. Mauricio Hernández Castellani

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a nuestras familias y amigos, por acompañarnos a lo largo de este camino.

A nuestra tutora, Alicia Dib por haber dedicado gran parte de su tiempo y esfuerzo a este trabajo conjuntamente con nuestro co-tutor, Gonzalo Suárez.

A la Facultad de Veterinaria, sus funcionarios docentes y no docentes que de una forma u otra han hecho posible.

A nuestros compañeros y compañeras de la Generación 2011 con quienes hemos compartidos inolvidables momentos en torno a nuestra Casa de Estudios.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Procesos farmacocinéticos LADME: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco.	9
Figura 2. Estructura química del núcleo Benzimidazole.	11
Figura 3. Estructura química de los BZD más importantes usados en medicina veterinaria.	12
Figura 4. Administración oroesofágica del Estandar Analítico del Principio Activo (EAPA).	23
Figura 5. Órganos y tejidos intra-abdominales sin particularidades macroscópicas de los animales participantes del grupo C ¹ .	24
Figura 6. Individuo sin presencia de lesiones en la zona de inoculación correspondiente al grupo C ² ₁ .	25
Figura 7. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C ² ₂ .	26
Figura 8. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C ² ₃ .	26
Figura 9. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C ² ₄ .	27
Figura 10. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C ² ₅ .	27
Figura 11. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C ² ₆ .	28
Figura 12. Presencia de líquido ascítico correspondiente a un animal del Grupo C ³ ₅ .	29
Figura 13. Presencia de líquido ascítico correspondiente a individuo del grupo C ³ ₆ .	30
Figura 14. Órganos y tejidos intra-abdominales sin particularidades macroscópicas de individuo perteneciente al Grupo C ³ ₁ .	30
Figura 15. Prueba de Rivalta positiva (izquierda) a líquido ascítico colectado en cavidad abdominal de los grupos C ³ ₅ y C ³ ₆ .	31
TABLAS	
Tabla 1. Dosificación (oral) de cinco grupos de animales con el EAPA.	20
Tabla 2. Dosificación (oral, subcutánea e intraperitoneal) de diferentes Grupos (n=6 c/u) de animales con un producto comercial en base a RBZ y su correspondiente excipiente.	21

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	Página 2
AGRADECIMIENTOS.....	Página 3
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	Página 4
RESUMEN.....	Página 6
SUMMARY.....	Página 6
INTRODUCCIÓN.....	Página 8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	Página 8
- 1. Biofarmacia.....	Página 8
- 2. Etapas farmacocinéticas.....	Página 9
- 3. Fármacos antiparasitarios.....	Página 10
- 4. Benzimidazoles.....	Página 10
- 4.1 Clasificación.....	Página 11
- 4.2 Propiedades.....	Página 12
- 4.3 Efectos adversos y Toxicidad.....	Página 13
- 5. Toxicidad medicamentosa aguda.....	Página 14
- 6. Las tres “R”.....	Página 15
- 6.1 Legislación actual en Uruguay.....	Página 16
HIPÓTESIS.....	Página 17
OBJETIVOS.....	Página 17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	Página 18
RESULTADOS.....	Página 22
DISCUSIÓN.....	Página 31
CONCLUSIONES.....	Página 35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Página 36

RESUMEN

El objetivo de este trabajo estuvo dirigido a evaluar mediante visualización directa la aparición de toxicidad clínica aguda de Ricobendazole en ratas macho (*Rattus norvegicus*) y visualizar posibles alteraciones macroscópicas en los diferentes órganos de los animales necropsiados. Se realizaron 2 ensayos, en el primero se trabajó con 10 animales, los cuales se agruparon en forma aleatoria en 5 grupos (n=2), a los cuales se les dosificó por vía oral en dosis crecientes el estándar analítico del principio activo. En el segundo ensayo se utilizaron 18 animales, que también se agruparon de forma aleatoria en 3 grupos (n=6) para dosificarlos de forma oral, subcutánea e intraperitoneal respectivamente, con un producto comercial en base a Ricobendazole en dosis crecientes y su correspondiente excipiente en equivalencia a la mayor dosis/volumen utilizado. A los individuos participantes del segundo ensayo se les practicó necropsia. Luego de cada ensayo, se procedió a la observación clínica de los animales para percibir la posible aparición de reacciones adversas y/o tóxicas o cambios comportamentales significativos, en diferentes intervalos de tiempo. Luego de la administración oro-esofágica los animales participantes en el primer ensayo presentaron un comportamiento normal, sin signos de toxicidad clínica. En cambio la formulación comercial en base a Ricobendazole, administrada por las vías sub-cutánea e intraperitoneal causó sintomatología clínica toxicológica en función a la dosis/volumen manejada.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the appearance of acute clinical toxicity and to visualize possible abnormalities in different organs of the necropsied animals after the administration of increased doses of the excipient of a commercial product based on Ricobendazole and the commercial product in whole via different administration routes in experimental male rats (*Rattus norvegicus*). Two trials were carried out. In the first one 10 animals were randomly grouped in 5 groups (n = 2), which were dosed orally with increasing doses of the analytical standard of the active principle. In the second trial, 18 animals were also randomly grouped into 3 groups (n = 6). They were dosed

per os, subcutaneously and intraperitoneally with a commercial product based on Ricobendazole in ascending doses and its corresponding excipient in equivalence to the highest dose / volume used. The experimental rats which participated in the second trial were necropsied. After each trial, clinical observation of the animals in different time intervals was carried out in order to evaluate possible appearance of adverse / toxic reactions or significant behavioral changes. After the oral administration, the animals presented a normal behavior, without signs of toxicity. On the other hand, the commercial formulation based on RBZ, administered by subcutaneous and intraperitoneal routes, caused clinical toxicological symptomatology depending on the dose / volume handled.

INTRODUCCIÓN

La terapéutica antiparasitaria, tiene un rol fundamental en la medicina veterinaria, con una gran evolución desde que comenzaron a utilizarse estos fármacos. Los aumentos de la demanda y las exigencias de los mercados, presionan para lograr una producción animal cada vez más eficaz. Un pilar fundamental para que esto se logre es una buena terapia antiparasitaria en los procesos de producción. La importancia económica de las enfermedades parasitarias en producción animal, ha producido avances más significativos en quimioterapia antiparasitaria en el área de la medicina veterinaria comparados con la medicina humana (Rubio y Boggio, 2009).

Para la práctica clínica, se requiere de un conocimiento epidemiológico del parásito involucrado y un entendimiento de las características de los fármacos antihelmínticos, disponibles en el mercado veterinario. Muchas son las herramientas farmacológicas que están a disposición en el mercado veterinario actual, muchas veces con las mismas moléculas pero con diferente formulación (Sánchez Bruni y col., 2006).

El desarrollo de estos fármacos para animales de compañía no es tan marcado como para las especies de producción, sin embargo, en esos animales, por su característica de convivir con humanos y tener un mayor contacto con ellos, se debe controlar aún más eficazmente la presencia de parásitos, ya que muchos de estos pueden causar enfermedades zoonóticas (Rubio y Boggio, 2009).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Biofarmacia

Esta disciplina, estudia como las propiedades físico-químicas de los fármacos, sus formas farmacéuticas y sus vías de administración, pueden afectar etapas de la farmacocinética (absorción y por ende su biodisponibilidad) de los diferentes principios activos. La interrelación entre los factores antes descritos, rigen que cantidad y a qué velocidad ese principio activo accede a la circulación sistémica. Para que un fármaco sea efectivo, necesita alcanzar

un receptor en el sitio de acción y permanecer unido a él el tiempo suficiente para ejercer su efecto farmacológico. Esto va a depender de la vía de administración, la forma farmacéutica y de su tasa de liberación (Ashford, 2002).

2. Etapas farmacocinéticas

Estas etapas se conocen con la sigla LADME y pone de manifiesto las diferentes etapas que ocurren en la mayoría de los fármacos: la liberación del principio activo una vez administrado en el organismo, el estudio de cómo se absorbe hacia la circulación sistémica y por ende su biodisponibilidad, la distribución en los tejidos, el metabolismo o biotransformación y la eliminación (Figura1).

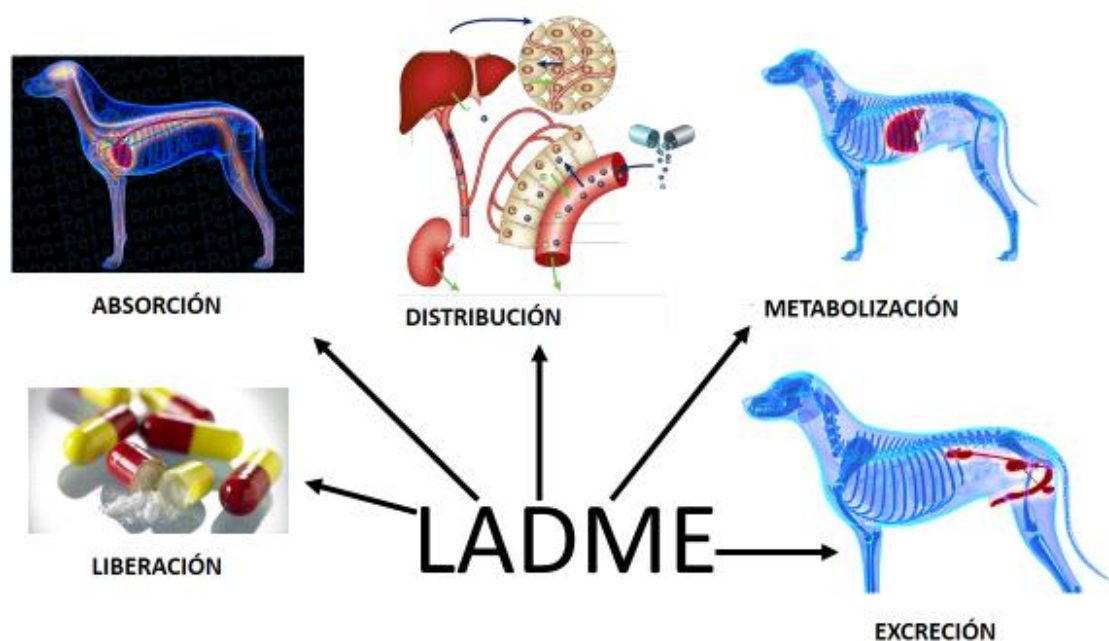


Figura 1. Procesos farmacocinéticos LADME: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco. (Extraído de Dib A, 2017).

Estas etapas, suponen el paso del principio activo, a través de las membranas biológicas. Es indispensable conocer los mecanismos por medio de los cuales los fármacos las atraviesan, así como las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y las membranas que modifican esta transferencia, para comprender la disposición de los fármacos en el organismo, como se distribuyen y llegan a

su sitio de acción, como se metabolizan y como son finalmente excretados y eliminados (Baggot y McKellar, 1994; Buxton y Bennet, 2011).

La administración de medicamentos por vía oral, es más segura que otras vías parenterales y evita que haya irritación tisular local en el sitio de inyección. En tanto, es más marcada la variación inter- e intraespecie, de la disponibilidad cuando se administra el medicamento por esta vía. Es por esto fundamental considerar las particularidades de la anatomía y de la fisiología del sistema gastrointestinal de las diferentes especies animales y la cantidad total de medicamento a ser administrado (Florio y col., 2017).

3. Fármacos antiparasitarios

Actualmente, algunos de los grupos químicos disponibles en el mercado farmacéutico veterinario, que actúan contra endoparásitos del tracto gastrointestinal y respiratorio de las diferentes especies de animales domésticos son: 1) Benzimidazoles metilcarbamatos, 2) Imidazotiazoles, 3) Lactonas Macrocíclicas, 4) Tetrahidropirimidinas y 5) Piperazínicos. 6) Derivados Amino Acetonitrílicos: Monepantel 7) Spiroindoles: Derquantel

4. Benzimidazoles

Los antihelmínticos Benzimidazoles (BZD), han alcanzado una notable trascendencia terapéutica a lo largo de muchos años, a razón de sus características de amplio espectro, baja toxicidad y bajo costo (Sánchez Bruni y col., 2002). El amplio espectro de acción de los compuestos BZD, queda determinado por la presencia durante el tiempo suficiente de concentraciones tóxicas del fármaco, en el sitio de localización de los parásitos (Álvarez y col., 2000).

Se caracterizan particularmente por su efecto frente a nematodos, sobre todo aquellos localizados en el tracto gastrointestinal, pero algunos pueden actuar contra cestodos y trematodos, tanto en la fase larvaria como en la de huevo (Sumano y Ocampo, 2006).

El primer fármaco BZD sintetizado fue el Tiabendazole en la década de 1960, luego por diversas sustituciones químicas se obtuvieron los BZD metilcarbamatos, caracterizados por poseer un grupo metilcarbamato en el anillo tiazol.

El núcleo químico BZD comprende un sistema de 2 anillos (bicíclicos) (Wagner y Millet, 1943), en los cuales un grupo benceno se fusiona en las posiciones 4 y 5 del anillo imidazol (heterocíclico) (Figura 2).

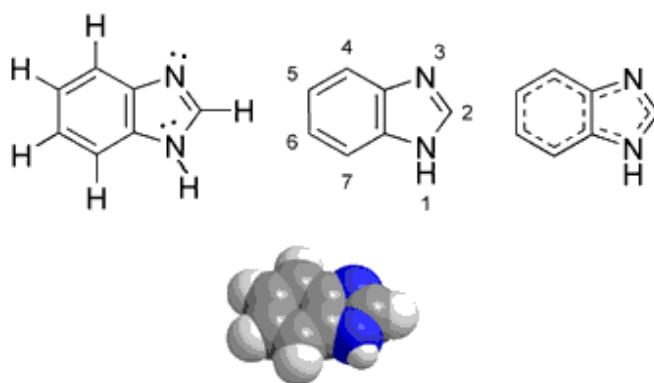


Figura 2. Estructura química del núcleo Benzimidazole. (Extraído de Townsend y Wise, 1990).

4.1. Clasificación

Los compuestos BZD más importantes se clasifican en: **BZD Tiazólicos** (Tiabendazole), **Pro-BZD** (Febantel y Netobimin), **BZD Metilcarbamatos** (Mebendazole, Oxibendazole, Albendazole, Albendazole Sulfóxido ó Ricobendazole, Fenbendazole, Oxfendazole) y **BZD Tioles Halogenados** (Triclabendazole), (Lanusse y col., 1993), (Figura 3).

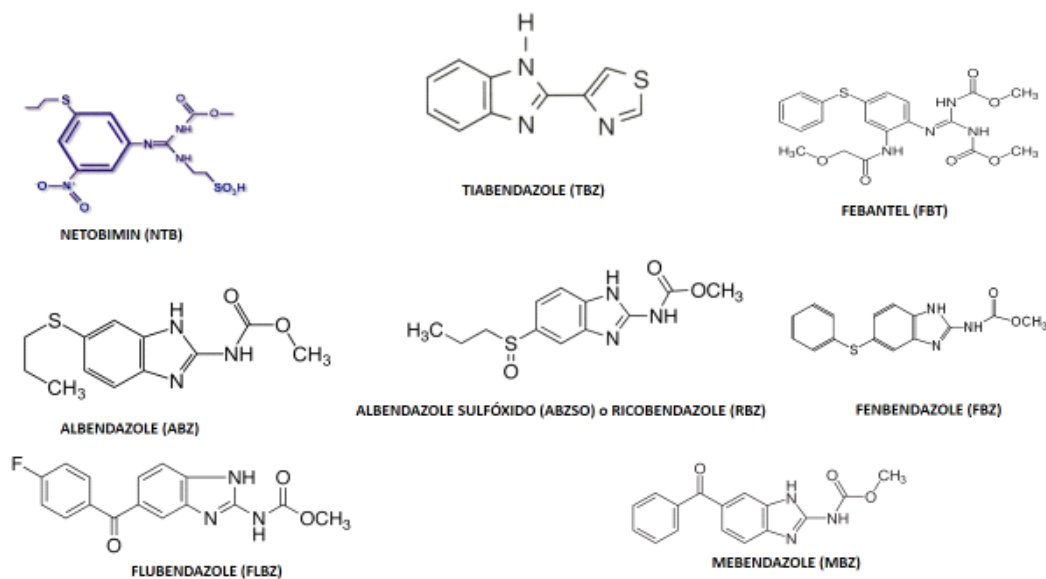


Figura 3. Estructura química de los BZD más importantes usados en medicina veterinaria. (Extraído de: Lanusse y col., 2009).

4.2. Propiedades

Los BZD, son sustancias cristalinas estables y con alto punto de fusión (223-304°C); además son relativamente insolubles en agua, benceno y éter, pero muy solubles en alcohol y disolventes no polares (Towsend y Wise, 1990). Son bases débiles (pK 6,8 y 7,8), por lo que se encuentran principalmente en su forma no ionizada a pH plasmático, lo cual favorece su distribución desde el plasma hacia diferentes tejidos, hecho especialmente importante para el intercambio reversible entre plasma y fluidos digestivos (Lanusse y col., 1993). El pasaje o distribución del fármaco / metabolito desde el plasma al tracto digestivo, está impulsado por el gradiente de pH entre el plasma y los diferentes segmentos del tracto GI. Ha sido demostrado que este mecanismo tiende a concentrar los metabolitos de Albendazole (ABZ) (sulfóxido y sulfonas) en el tracto GI, lo cual es particularmente importante en el caso del estómago, donde el pH más ácido que a nivel intestinal, favorece el atrapamiento iónico del fármaco (Lanusse y col., 1993; Sánchez Bruni y col., 2002).

El Ricobendazole (RBZ) o ABZ sulfóxido (ABZSO) es un BZD metilcarbamato, derivado de la sulfoxidación del ABZ en primera fase hepática. Tiene acción antihelmíntica y es el único BZD que está en condiciones de administrarse en forma parenteral como inyectable subcutáneo en rumiantes (Sanchez Bruni y col., 2006).

Se han estudiado diversas estrategias farmacológicas para incrementar la eficacia de los antihelmínticos BZD. Actualmente el metabolito RBZ está comercialmente disponible en Argentina, formulación desarrollada por laboratorios AFFORD, como solución dentro de una cápsula blanda para administración oral en caninos (Saumell y col., 2006).

4.3. Efectos adversos y Toxicidad

No se encontraron a la fecha del presente ensayo, trabajos científicos que hubieran estudiado la toxicidad aguda de RBZ en animales de experimentación o reportes de notificaciones adversas o tóxicas de perros tratados con esta molécula. Sin embargo, los trabajos publicados sobre toxicidad aguda y valores de dosis letal 50 (DL50), del fármaco madre ABZ en animales de experimentación, indican que la DL50 de ABZ en ratas por vía oral, oscila entre 1.320 a 2.400 mg/kg (Dayan, 2003). Stokol y col., (1997), indicaron que una dosis de 30 a 40 mg/ kg de ABZ durante 4 a 90 días en perros, causó anemia reversible, leucopenia y pérdida de peso. También, observaron que un perro desarrolló toxicidad de la médula ósea, luego de la administración de ABZ (25 mg/kg, c/24 hs) durante 5 días, seguido por la administración de 50 mg/kg *per os* cada 12 hs durante 5 días. Los resultados observados por Stokol y col., (1997), permiten evidenciar que las reacciones adversas que se detallaron en los animales de ese estudio, pudieron ser debidas a que los perros recibieron durante varios días, dosis superiores a la dosis terapéutica convencional.

El uso de medicamentos en base a estos fármacos, debe ser medurado ya que su empleo indiscriminado puede resultar en toxicidad crónica cuando son utilizados durante un largo periodo de tiempo, pudiendo causar también toxicidad aguda cuando se utilizan altas dosis (sobredosificación).

La dosis terapéuticas de RBZ, establecidas para la administración oral (comprimidos) en caninos es de 20mg/kg (Saumell y col., 2006).

5. Toxicidad medicamentosa aguda

La toxicidad aguda a diferencia de la crónica se define como el efecto no deseado que se produce inmediatamente o en un intervalo de tiempo corto después de una sola o múltiples administraciones de altas dosis de una sustancia. Dicho efecto es cualquiera que produce alteraciones funcionales en órganos y/o lesiones bioquímicas, que podrían alterar el funcionamiento del organismo en los órganos generales o individuales (Wallum, 1998).

Para determinar la toxicidad aguda de un fármaco, se realizan estudios que establecen la dosis de efecto no deseado que resulta tóxica o incluso que puede causar la muerte del animal tratado. Un parámetro importante que tiene lugar en la medición de la toxicidad aguda es la evaluación de la dosis letal 50 (DL 50) (Akhila y col., 2007).

La evaluación de la toxicidad medicamentosa de los agentes farmacológicos es un procedimiento muy importante que por lo general se realiza antes que se permita la inserción del fármaco en el mercado. Desafortunadamente la mayoría de estos estudios requieren un número alto de animales de experimentación, por lo que es importante desarrollar un método donde se pueda utilizar un número menor de animales y en donde se pueda obtener los mismos resultado o incluso más exactos (Chinedu y col., 2013).

Por ende es de vital importancia que los profesionales en esta rama de la toxicología experimental conozcan los métodos abreviados que existen actualmente para evaluar la toxicidad aguda de un producto, las cuales en su momento se crearon para cumplir con el principio de las 3 "R" (reducción, refinamiento y reemplazo), y de esta forma trata de utilizar la menor cantidad de animales posibles y que la muerte no fuese el objetivo fundamental de este tipo de investigación sino la aparición de la llamada toxicidad evidente o signos y síntomas de toxicidad como criterio de punto final (*endpoint*) de su protocolo de trabajo de investigación (Arencibia y col., 2003).

6. Las tres “R”.

En la actualidad el recurso internacional para la evidencia científica en la investigación, sigue basándose en la experimentación con animales. No obstante esto, debemos siempre tener presente los principios éticos de experimentación haciendo un fuerte hincapié en el concepto de “las tres R”.

Reemplazar

El uso de animales debe reemplazarse con técnicas alternativas o evitarse por completo.

Las técnicas que no emplean animales suelen desencadenar avances en la ciencia y la tecnología. Nuevos planteamientos como la ingeniería tisular, las tecnologías con células madre y la modelización informática resultan prometedores para el reemplazo de los animales en algunos campos de la investigación. Sin embargo, muchos métodos alternativos, como los cultivos celulares, a menudo solamente proporcionan información muy limitada sobre lo que ocurre en un animal vivo completo. Los esfuerzos empleados para reemplazar las pruebas de seguridad han cosechado algunos éxitos notables, en particular para la evaluación de sustancias aplicadas en la piel.

Reducir

El número de animales utilizados se debe reducir al mínimo, al objeto de obtener la información con menos animales o de obtener más información con el mismo número de animales. Se ha conseguido un progreso considerable en la búsqueda de métodos para reducir el número de animales utilizados en los experimentos. Se puede conseguir una mayor reducción mediante la revisión de las conclusiones de los estudios ya realizados (por ejemplo, mediante revisiones sistemáticas), mejorando los modelos animales y mediante el uso de buenos diseños experimentales.

Refinar

La forma de realizar los experimentos debe ser refinada, a fin de garantizar que los animales sufran lo menos posible. Esto incluye la mejora de las

instalaciones en las que viven y de los procedimientos que minimizan el dolor y el sufrimiento, y/o del bienestar de los animales.

El refinado no solamente beneficia a los animales de experimentación, sino que también puede mejorar la calidad de las conclusiones de la investigación, al reducir el nivel de estrés de dichos animales. El sufrimiento de cualquier animal participante en cualquier ensayo de experimentación siempre se debe minimizar, por ejemplo, utilizando protocolos analgésicos y anestésicos para cualquier maniobra que implique dolor o incomodidad. Si los animales sufren una enfermedad dolorosa o fatal, pueden ser sacrificados humanamente antes de que presenten síntomas graves. Los animales de laboratorio pasan mucho tiempo en las instalaciones en las que viven mientras no están siendo utilizados en un experimento, por tanto el mejorar sus condiciones de vida implica lo que se conoce como enriquecimiento medioambiental. Recientemente se ha producido un debate sobre las pruebas de toxicidad aguda y si muchos de estos ensayos de seguridad tempranos de los fármacos pueden sustituirse por otros métodos. En enero de 2008, una completa revisión de las pruebas de toxicidad farmacéuticas realizada en el Reino Unido demostró que los datos de una determinada prueba de toxicidad se pueden recopilar de otras pruebas. Esto ya ha permitido una reducción del 70% en el uso de animales para pruebas de toxicidad aguda en las empresas participantes en la revisión y se espera que esto vaya seguido de unas reducciones mayores en el plano mundial (Endersby, 2007).

6.1. Legislación actual en Uruguay

En octubre de 2009 el Poder Legislativo aprobó la Ley N° 18.611 denominada *Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica*.

(<https://legislativo.parlamento.gub.uy/temporales/leytemp7254109.htm>).

La misma dispone lineamientos en cuanto al trato adecuado de los animales, evitando o minimizando el sufrimiento físico y dolor. Asimismo, se explicitan las directivas para el uso y manejo de animales de experimentación en todo el territorio nacional.

HIPÓTESIS

La administración de RBZ por diferentes vía de administración (oral, sub-cutánea o intraperitoneal) induce un cuadro de toxicidad aguda en diferentes dosis en ratas de experimentación.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la influencia del RBZ en forma pura (estándar analítico del principio activo) y en presentación comercial, dosificación y vías de administración en la aparición de toxicidad clínica aguda de RBZ en ratas de experimentación.

Objetivos específicos

- Evaluar en forma clínica la aparición de toxicidad aguda en ratas de experimentación (*Rattus norvegicus*), luego de la administración oral del estándar analítico del principio activo a dosis ascendentes.
- Describir la sintomatología clínica en la misma especie animal, luego de la administración de una formulación comercial en base a RBZ a dosis ascendentes y por diferentes vías de administración.
- Visualizar posibles alteraciones macroscópicas en los diferentes órganos de los animales necropsiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*), raza Wistar, sexo macho, de seis semanas de edad, con una masa corporal de 250 ± 50 g, procedentes de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (U.R.B.E), de la Facultad de Medicina, UdelaR. Según el funcionamiento de la Unidad y criterios de bioética internacional, los animales fueron alojados en cajas plásticas estandarizadas con tapa en forma de rejilla, recibieron alimento balanceado pelletizado y agua sin restricciones. Los mismos se mantuvieron en salas climatizadas a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa entre 30% y 70% y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Previo a los tratamientos farmacológicos a evaluar, los individuos mantuvieron un ayuno de 8 horas.

El manejo de los animales durante los ensayos experimentales, estuvo supervisado por personal técnico encargado de la U.R.B.E. y el experimento se realizó en las mismas instalaciones. Todos los animales fueron clínicamente examinados por personal competente del U.R.B.E. certificando que los animales se encontraban sin particularidades.

El protocolo y manejo de los animales fue presentado y aprobado (Protocolo nro. 285/2016) por el Comité de Ética (CEUA) de la Facultad de Medicina (UdelaR), Montevideo Uruguay.

Fármacos y sustancias químicas

En los ensayos experimentales se utilizó:

- Un estándar analítico del principio activo (EAPA) en forma de polvo, el cual fue donado por el Laboratorio de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina, en el marco de trabajo del equipo interdisciplinario existente con el Área Farmacología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

- Un producto comercial en base a RBZ 13,6% (Parasules 40[®], Laboratorios Microsules, Uruguay S.A.), en forma de solución de administración sub-cutánea para la especie bovina. Este producto fue donado por dicho laboratorio.
- El excipiente de la mencionada presentación comercial, el cual también fue donado por el laboratorio de la marca registrada.
- Agua destilada.

Otros materiales utilizados

- Balanza de precisión (wtb 200, USA).
- Ph-metro (Wisestir MSH-20D, USA).
- Tubos de ensayos. (5ml, 8ml).
- Agujas de 23 G. y 27 G.
- Sondas oroesofágicas para la administración oral.
- Jeringas graduadas descartables de 1ml y 5ml.
- Cajas de alojamiento de animales de experimentación
- Tijera.
- Bisturí.
- Pinza diente de ratón.

Metodología de trabajo

La metodología a utilizar se basó en el método propuesto por Chinedu y col., 2013 y la OECD *Guidelines for Testing Chemicals* (2001).

Se realizaron 2 ensayos experimentales:

Ensayo 1. Se trabajó con 10 animales, los cuales se agruparon en forma aleatoria en 5 grupos (n=2). Los grupos fueron identificados como G más un número correlativo. Se les dosificó en forma de monodosis por vía oro-

esofágica (Tabla 1). El EAPA se solubilizó en agua destilada. Los diferentes volúmenes, se correlacionan con las dosis mg/kg administrados a cada grupo. Se partió de 20mg/kg como dosis inicial de referencia ya que es aquella terapéutica administrada por vía oral en caninos con un producto comercial, luego las dosificaciones se fueron ascendiendo en forma exponencial de forma arbitraria hasta los 160mg/kg. Dicha dosis es la mayor a la que se pudo vehicular el EAPA por sonda oro-esofágica, dado su condición de insoluble.

El manejo, adecuación y preparación de las dosis del EAPA se realizó en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Los animales participantes de este ensayo permanecieron con vida.

Tabla 1. Dosificación monodosis (oro-esofágica) de cinco grupos de animales con el EAPA.

Grupo vía oral	Dosis mg/kg EAPA solubilizado	Volumen (ml)
G1	0	0,32*
G2	20	0,04
G3	40	0,07
G4	80	0,17
G5	160	0,32

G: grupo, G1= control. * Agua destilada, EAPA: estándar analítico del principio activo.

Ensayo 2. Se trabajó con 18 animales, los cuales se agruparon aleatoriamente en 3 grupos (n=6). Los grupos fueron identificados como C (C¹: vía oral, C²: vía sub cutánea, C³: vía intraperitoneal), más un número correlativo (del 1 al 6) A todos los individuos participantes de este ensayo se les practicó necropsia. Las dosificaciones (únicas para cada individuo) para la vía oro-esofágica, sub cutánea e intraperitoneal, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Dosificación (oro-esofágica, subcutánea e intraperitoneal) de diferentes Grupos (n=6 c/u) de animales con un producto comercial en base a RBZ y su correspondiente excipiente.

Grupo Vía oral	Dosis mg/kg RBZ 13,6%	Volumen (ml.)
C¹1	0	0,32*
C¹2	20	0,04
C¹3	40	0,07
C¹4	80	0,17
C¹5	160	0,32
C¹6	Excipiente	0,32
Vía sub-cutánea		
C²1	0	0,32*
C²2	20	0,04
C²3	40	0,07
C²4	80	0,17
C²5	160	0,32
C²6	Excipiente	0,32
Vía intraperitoneal		
C³1	0	0,32*
C³2	20	0,04
C³3	40	0,07
C³4	80	0,17
C³5	160	0,32
C³6	Excipiente	0,32

Se utilizó el volumen de excipiente equivalente al volumen utilizado a mayor dosis. * Agua destilada, RBZ: Ricobendazole

Manifestaciones clínicas

Luego de cada ensayo, se procedió a la observación clínica de los animales para percibir la posible aparición de reacciones adversas y/o tóxicas o cambios comportamentales significativos que se explican más adelante, en diferentes intervalos de tiempo: a) durante primera hora post administración, b) durante 10

minutos en cada hora siguiente hasta completar las 24h desde la última dosificación.

Las observaciones estuvieron dirigidas a los siguientes puntos, según la dosis administrada y la vía de administración utilizada:

1- Signos y síntomas de toxicidad incluyendo su comienzo y duración

2- Se prestó especial atención a la potencial ocurrencia de salivación, regurgitación, alteraciones gastrointestinales (diarrea, hematoquexia), signos clínicos de peritonitis o sepsis tales como distensión abdominal, ausencia de evacuaciones, letargo, somnolencia, coma y muerte.

3- Alteraciones en la integridad de piel y sub cutáneo luego de la administración de la formulación comercial y su respectivo excipiente por las vías sub cutánea e intraperitoneal; membranas mucosas y oculares, actividad somatomotora, cambios conductuales (aislamiento, inmovilidad, agresividad, actitud ante la alimentación y consumo de agua).

4- Muerte y tiempo de ocurrencia.

Necropsia

Al finalizar este ensayo (24 h después del comienzo del mismo), todos los animales participantes fueron sacrificados mediante dislocación cervical. En los animales necropsiados en lo que se observó la presencia de líquido intraperitoneal, se realizó la prueba de Rivalta.

RESULTADOS

Ensayo 1

Luego de la administración oro-esofágica (Figura N°4) del EAPA solubilizado en agua destilada a los animales participantes de este ensayo, no se observaron ninguno de los puntos antes mencionados.

Los animales presentaron un comportamiento normal, realizando sus grandes funciones (ingesta de líquidos y sólidos, defecación y micción) sin particularidades.



Figura 4. Administración oro-esofágica del Estandar Analítico del Principio Activo (EAPA).

Ensayo2

La observación luego de la administración vía oro-esofágica en dosis crecientes del producto comercial en base a RBZ y su correspondiente excipiente arrojó resultados similares a los del Ensayo 1. En la necropsia de los individuos no se visualizó ninguna alteración macroscópica de órganos y tejidos en ninguno de los grupos estudiados (Figura 5).

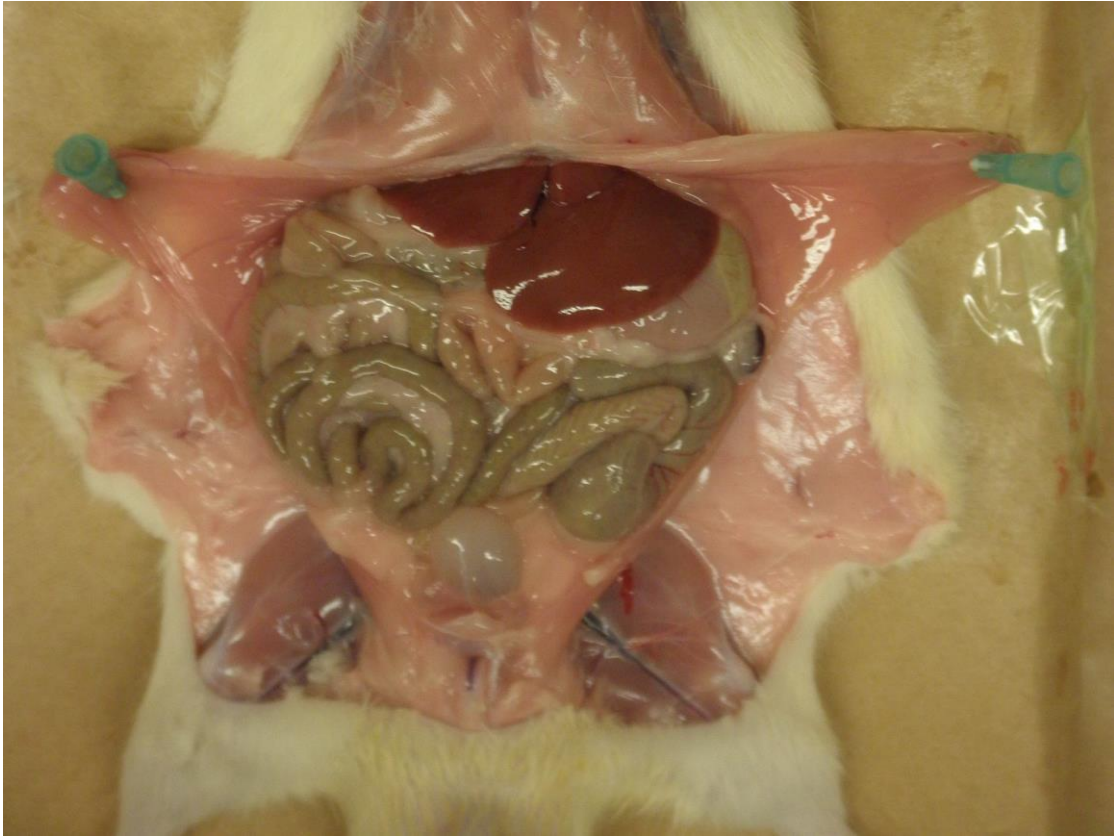


Figura 5. Órganos y tejidos intra-abdominales sin particularidades macroscópicas de los animales participantes del grupo C¹.

A los animales pertenecientes al Grupo C² (administración sub-cutánea), se le pudo percibir signos de hiperactividad, vocalización y dermatitis exudativa con alopecia en la zona de inoculación, que se acentuó en función de las dosis administradas, en los primeros 5 minutos post administración en todos los grupos a excepción del grupo C²₁ (Figura 6). Los siguientes grupos presentaron lesiones desde 0,2 cm x 0,2cm (Grupo C²₂ (Figura 7), 0,6 cm x 0,6 cm (Grupo C²₃ (Figura 8), 1.0 cm x 1.2 cm (Grupo C²₄ (Figura 9) hasta lesiones de 1,5 x 2,0 cm (Grupo C²₅ (Figura 10) y C²₆ (Figura 11).

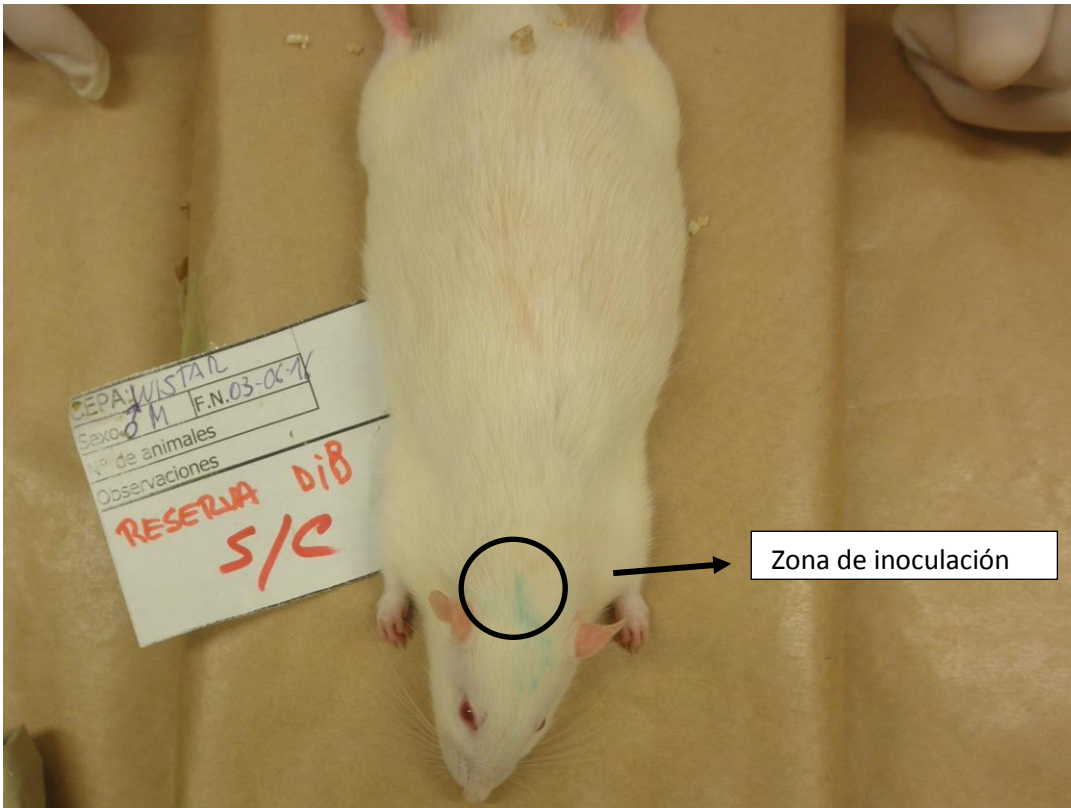


Figura 6. Individuo sin presencia de lesiones en la zona de inoculación correspondiente al grupo C²1.

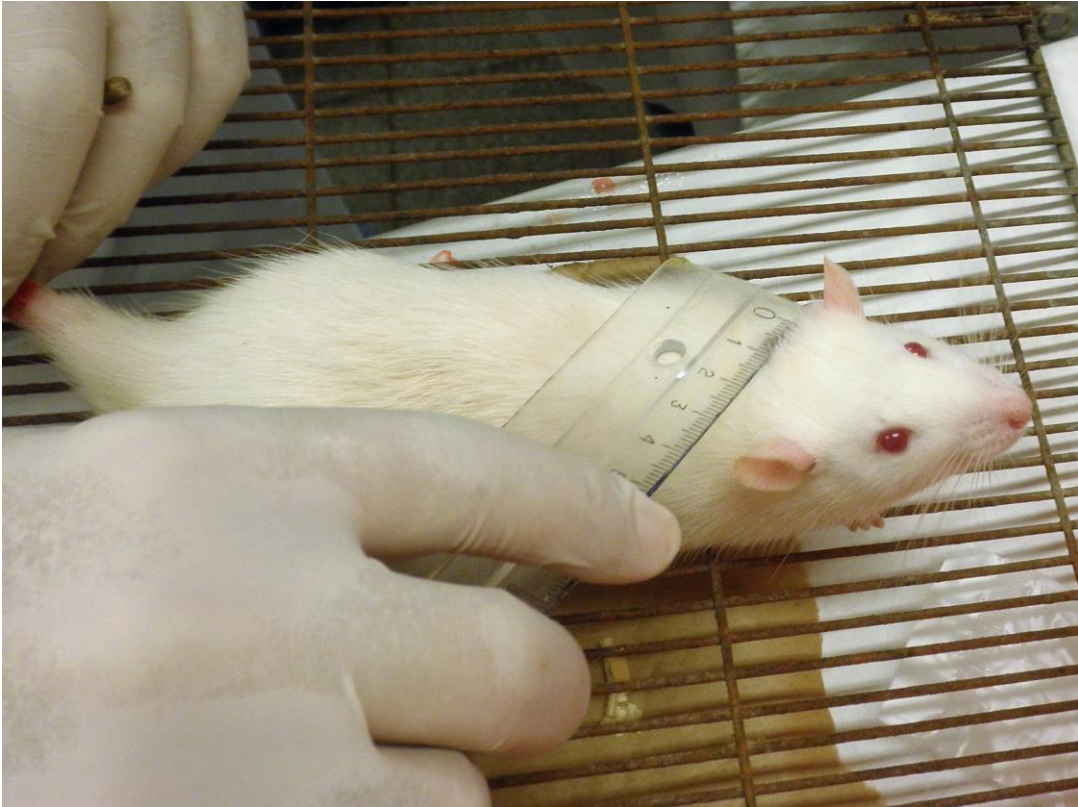


Figura 7. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C².



Figura 8. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C³.



Figura 9. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C²4.

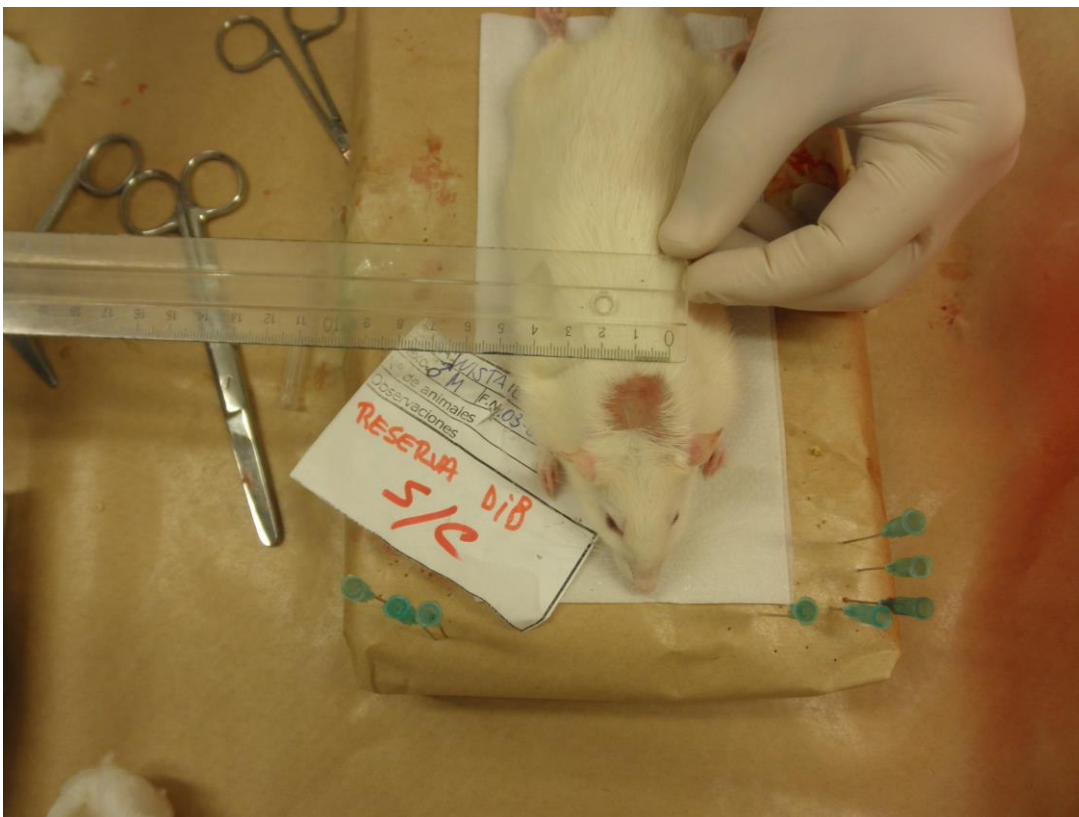


Figura 10. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C²5.



Figura 11. Dermatitis exudativa correspondiente al grupo C²⁶.

En el Grupo C³ (vía intraperitoneal), se observó signos de molestias, comportamiento anormal (falta de acicalamiento, vocalizaciones y aislamientos intermitentes), en los primeros 5 minutos post inoculación y fueron expresados con mayor notoriedad en los Grupos C³⁵ y C³⁶, a excepción del Grupo C³¹.

En la necropsia de los animales pertenecientes a este Grupo C³ se pudo observar la presencia de inflamación de los órganos intra-abdominales y ascitis (Rivalta positivo) solamente en los Grupos C³⁵ (Figura 12) y C³⁶ (Figura 13).

Sin embargo este síntoma no se apreció en los Grupos C³2, C³3, C³4 (ver Tabla 1), ni en el Grupo C³1 (Figura 14).

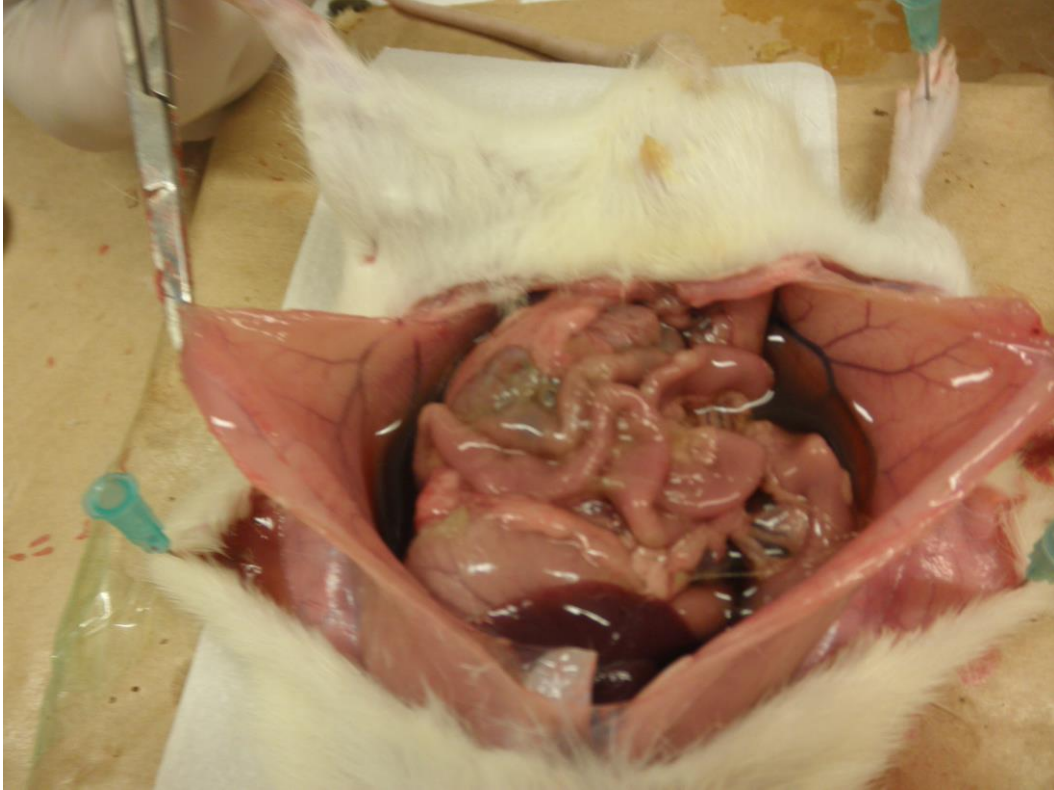


Figura 12. Presencia de líquido ascítico correspondiente a un animal del Grupo C³5.



Figura 13. Presencia de líquido ascítico correspondiente a individuo del grupo C³6.

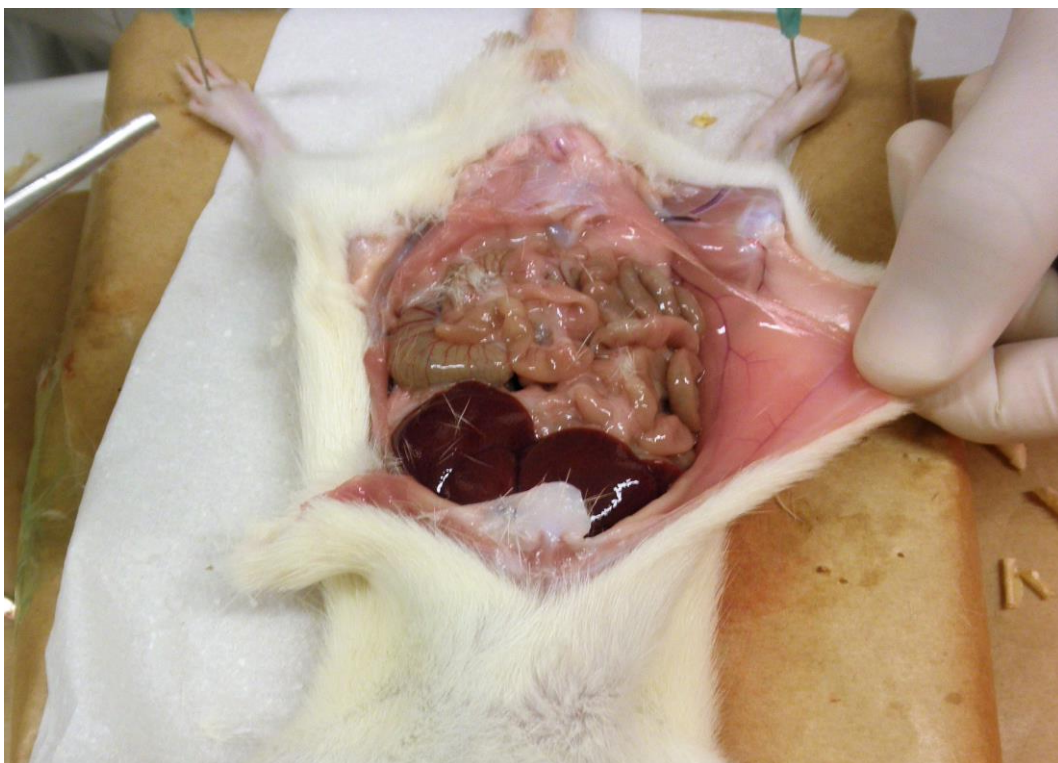


Figura 14. Órganos y tejidos intra-abdominales sin particularidades macroscópicas de individuo perteneciente al Grupo C³1.

La prueba de Rivalta realizada al líquido intraperitoneal encontrada en la cavidad abdominal de los grupos C³⁵ y C³⁶, confirmó la presencia de exudado inflamatorio (Figura 15).

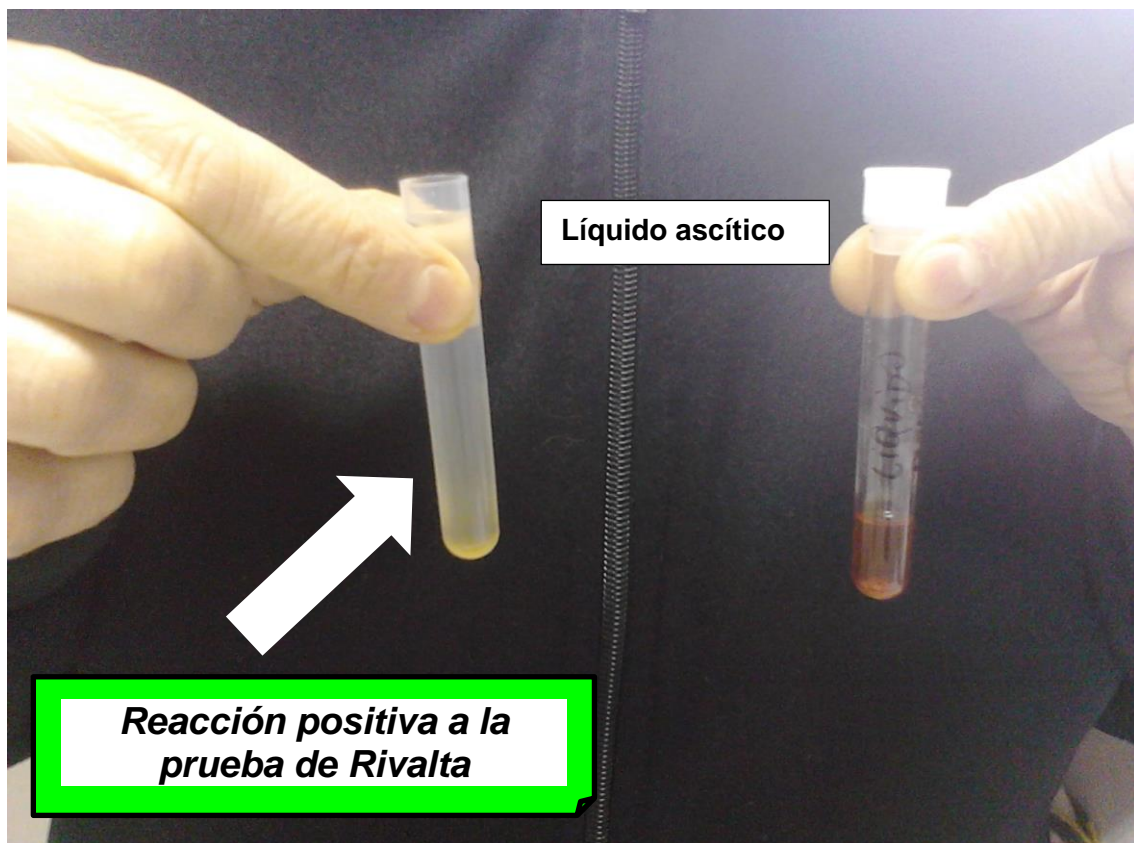


Figura 15. Prueba de Rivalta positiva (izquierda) a líquido ascítico colectado en cavidad abdominal de los grupos C³⁵ y C³⁶.

DISCUSIÓN

En la tercera Auditoría de Calidad de la Cadena Cárnica vacuna, realizada en el periodo de 2013-2015 por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y el Instituto Nacional de Carnes (INAC), con el objetivo de determinar y cuantificar los principales factores responsables de las pérdidas de valor en la cadena cárnica, se confeccionó un cuestionario de potenciales problemas que podrían aparecer en las distintas etapas del proceso (corrales de espera, playa de faena, cámaras de frío y sala de desosado). Los abscesos y lesiones por

inyecciones fueron considerados problemas severos dentro de la playa de faena estimándose que causan una pérdida de 0,28 dólares por animal determinando que las causas se deben principalmente a la calidad del producto y a las prácticas de inoculación (https://www.inac.uy/innovaportal/file/3015/1/Cartilla_Vacuna_2003_vers_FINA_L.pdf).

Los datos aportados en esta Tesis son importantes ya que hay estudios en los que se demuestra que la inoculación sub-cutánea de productos antiparasitarios en base a RBZ en bovinos genera lesiones locales. Un trabajo realizado en rumiantes por el Área de Parasitología. INTA RAFAELA y Dpto. Técnico del Laboratorio OVER S.R.L. utilizando un producto comercial en base a RBZ 15% mostró tumefacciones en el sitio de inoculación sub-cutánea. Éstas comenzaron a revertirse partir del día 10 post tratamiento. Cuando la dosis se incrementó a dos, dos y media y tres veces las indicadas, se produjo un mayor número de tumefacciones las que remitieron hacia el día 25 post tratamiento. El análisis histopatológico del sitio de inoculación reveló en algunos animales (en mayor número los tratados con dosis altas), degeneración hialina muscular y necrosis de Zenker, presentando en el intersticio un tejido de granulación maduro, rico en histiocitos y células gigantes. (<http://webs.satlink.com/usuarios/l/labover/e/e7608.htm>).

Sabiendo que en el presente trabajo de Tesis, se manejaron los volúmenes y vías de administración sugeridas para las buenas prácticas en animales de experimentación en diferentes bibliografías, podemos descartar que dichos resultados fueran producto de algún defecto de manipulación.

En el Ensayo 1, luego de la administración oral del EAPA no se observaron cambios significativos comportamentales o alteraciones clínicas de las grandes funciones en los animales. Se sugiere que esto puede ser debido a la alta tasa metabólica que normalmente exhibe esta especie en comparación con otras especies de monogástricos en las cuales se utiliza este PA (Petry, 2005). Dado que el metabolismo energético de un organismo pluricelular guarda una estrecha relación con su masa celular, o peso corporal, la tasa de metabolismo

energético de los animales grandes tiene un valor absoluto superior al de los pequeños. Sin embargo por kilogramo de peso corporal, los animales grandes tienen una tasa de metabolismo energético inferior a la de los animales pequeños (Petry, 2005). Por lo tanto una disminuida absorción y rápida eliminación (alta tasa metabólica), no permitiría que cualquier producto medicamentoso permaneciera el tiempo suficiente en contacto con las mucosas digestivas como para lograr una absorción que llevara a generar sintomatología toxicológica.

Es necesaria la disolución de las partículas en suspensión de la formulación farmacéutica de un fármaco BZD en los fluidos gastrointestinal, para facilitar la absorción de los mismos a través de la mucosa gastrointestinal y lograr una adecuada biodisponibilidad plasmática. La solubilidad de ABZ es de 0,01 mg / ml en agua (Galia y col., 1999). La solubilidad de RBZ es de 0,062 mg / ml en agua (Wu y col., 2005). El alto margen de seguridad, particularmente de aquellos compuestos sustituidos que conforman los antihelmínticos más potentes del grupo, se relaciona con la baja solubilidad de los mismos en el fluido gastrointestinal y consecuentemente con la baja absorción que les impide alcanzar elevadas concentraciones en el plasma para provocar signos de toxicidad.

En líneas generales, la baja solubilidad mencionada, puede limitar la liberación, la absorción y por ende la biodisponibilidad plasmática del fármaco administrado por la vía oral, dado que los BZD deben alcanzar una buena disolución en los fluidos GI para lograr dicha absorción por las mucosas (Mc Kellar y col., 1993). Sin embargo en este Ensayo, el parámetro de la baja solubilidad mencionado afectó la vehiculización del EAPA y no la liberación, ya que se usó el principio activo puro.

En el Ensayo 2 se observaron cambios comportamentales interpretados como episodios álgidos, vocalizaciones y falta de acicalamiento (Langford y col., 2010), en los primeros minutos post administración. Los efectos observados luego de la administración sub-cutánea se pueden atribuir al bajo pH (0,41) que requiere el excipiente para vehiculizar el RBZ y no tanto al principio activo del mismo. Es decir, estos daños en los tejidos más

próximos a la zona de inoculación son indicadores de la agresividad de un producto con el grado de acidez mencionado. Es necesario que el pH y la osmolaridad de la fórmula farmacéutica no sean muy diferentes de aquellas existentes en los tejidos, para evitar la aparición de escaras u otras lesiones en el sitio local de administración (Florio y col., 2017).

Luego de la administración intraperitoneal tanto del excipiente como del producto medicamentoso, se observó en forma macroscópica alteraciones de tipo inflamatorio en órganos intra-abdominales con una importante producción de líquido ascítico (Figura 15). El peritoneo es un tejido altamente reactivo a la inflamación. El epiplón en los roedores tiene una gran capacidad quimioattractora de neutrófilos, por lo que al exponerlo a la inyección de cualquier sustancia, incluyendo soluciones electrolíticas, produce una reacción inflamatoria (Fakatsu y col., 1996).

En el presente trabajo, la observación del líquido ascítico se puede atribuir a la injuria inflamatoria causada por el producto comercial y/o su correspondiente excipiente. A los máximos volúmenes administrados de la presentación comercial en base a RBZ y del correspondiente excipiente se observó la presencia de líquido ascítico en cavidad abdominal.

Por tanto, se produjo un aumento de la permeabilidad microvascular que se asocia comúnmente con una reacción inicial que induce la liberación localizada de mediadores que causan vasodilatación y una mayor permeabilidad. Los aumentos inmediatos en la permeabilidad son inducidos por mediadores tales como histamina, bradiquinina, leucotrienos y sustancia P, que causa la contracción de las células endoteliales y la ampliación de las brechas interendoteliales, liberación subsecuente de citoquinas tales como interleuquina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF). El γ -interferón induce re-arreglos citoesqueléticos dentro de las células endoteliales que dan como resultado la retracción de las células endoteliales y un ensanchamiento más persistente de las brechas interendoteliales. Los movimientos del fluido intervascular a través de estas brechas en el intersticio producen un edema localizado que puede diluir un agente inflamatorio agudo. La reacción termina con un edema y retrocede cuando el estímulo es leve. Sin embargo, la mayoría

de los casos progresan a la fuga de proteínas plasmáticas y la emigración de leucocitos como eventos tempranos en la formación de un exudado inflamatorio agudo (Mosier, 2007).

Por todo lo antes dicho, la prueba de Rivalta realizada con el líquido intra-abdominal, demostró un resultado positivo para un exudado inflamatorio.

En el presente estudio se cumplió con el principio de las 3 R dado que con un bajo número de animales se logró demostrar un efecto adverso que potencialmente podría relacionarse con el alto número de reacciones adversas similares advertidas por los fabricantes de zoterápicos en base a RBZ inyectable por vía sub-cutánea en bovinos.

CONCLUSIONES

Se pudo concluir que tanto la administración del EAPA como de la presentación comercial a base de RBZ por vía oro-esofágica, no causó sintomatología clínica de toxicidad dada la alta tasa metabólica de la especie utilizada. Sin embargo, la formulación comercial en base a RBZ administrada por las vías sub-cutánea e intraperitoneal causó sintomatología clínica toxicológica aguda en función a la dosis/volumen manejada.

En este trabajo, no se pudo concluir que el producto comercial en base a RBZ o su correspondiente excipiente por separado hayan sido los responsables de las alteraciones observadas en tejido subcutáneo, alteraciones inflamatorias en órganos y estructuras intraperitoneales, o la presencia de líquido ascítico, a la mayor dosis administrada. Esto se explica porque fue imposible inyectar el EAPA por vía sub-cutánea o intra-peritoneal por la insolubilidad mencionada. Si dicha administración hubiera sido posible y causado las lesiones descritas en piel, subcutáneo y órganos intra-abdominales, entonces hubiera sido contundente la afirmación de cuál de las sustancias administradas hubiera sido la responsable de los efectos adversos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Akhila JS, Deepa S, Alwar MC. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose (2007) Curr Sci; 93: 917-920.
- 2) Alvarez L, Sanchez Bruni S, Lanusse C, Sallovitz J. (2000). Enhanced plasma and target tissue availabilities of albendazole and albendazole sulphoxide in fasted calves: evaluation of different fasting intervals. J. Vet Pharmacol Therap; 23: 409-419.
- 3) Arencibia-Arrebola, FD., Fernandez, R.L.A, López-Feria, Y., Fariñas-Medina, M., Infante-Bourzac, J.F., Prieto-Díaz, J.L (2003). Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. Retel Revista de Toxicología; 1-15.
- 4) Ashford M. (2002). Introduction to Biopharmaceutics. En: Pharmaceutics: The Science of dosage form design. Aulton ME, 2nd ed., Churchill Livingstone, p. 213-216.
- 5) Auditoría de Calidad de la carne vacuna. (https://www.inac.uy/innovaportal/file/3015/1/Cartilla_Vacuna_2003_vers_FINA_L.pdf). Fecha de consulta: 02/02/2019.
- 6) Baggot J, McKellar Q. (1994). The absorption, distribution and elimination of antihelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. J Vet Pharmacol Therap; 17: 409-419.
- 7) Buxton I, Benet L. (2011). Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos. En: Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 12ª ed. Mexico, Mc GrawHill,, p.17-41.

- 8) Chinedu E, Arome D, Solomon F. (2013). A New Method for Determining Acute Toxicity in Animal Models. *Toxicol Int.* 20(3): 224–226.
- 9) Dayan A. (2003). Albendazole, Mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*; 86: 141-159.
- 10) Dib A. (2017). Evaluacion biofarmaceutica y eficacia clínica de nuevas formulaciones de liberación modificada en base a ricobendazole en caninos. Tesis Facultad de Veterinaria, Udelar, 146 p.
- 11) Endersby J. (2007). Disponible en: <http://www.animalresearch.info/es/el-diseno-de-la-investigacion/alternativas-y-las-3r/>. Fecha de consulta: 09/05/2018.
- 12) Fakatsu K, Saito H, Han I, Yasuhara H, Lin MT, Inoue T. (1996). The great omentum is the primary site of neutrophil exudation in peritonitis. *J Am Coll Surg*; 183: 450-456.
- 13) Florio J, Benedito de Sousa A, Gorniak S. (2017). Farmacocinética. En: Spinosa H, Górnica S, Bernardi M. *Farmacología aplicada a medicina veterinaria*. 6ª ed., Ed. Grupo Editorial Nacional (GEN), Sao Pablo, pp. 37-62.
- 14) Galia E, Horton J, Dressman J. (1999). Albendazole Generics-a comparative in vitro study. *Pharmaceutical Research*; 16: 1871-1875.
- 15) Guideline, P. B. T. (2001). OECD guideline for the testing of chemicals. *The Hershberger*, 601, 858.
- 16) Langford D. J., Bailey A. L., Chanda M. L., Clarke S. E., Drummond T. E., Echols S., Matsumiya L. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447-449.

- 17) Lanusse C, Alvarez C, Sallovitz A, Mottier L, Sanchez Bruni S. (2009). Antinematodal drugs. En: Riviere JE , Papich MG. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 9a.ed. ciudad, Wiley, p. 1053-1094.
- 18) Lanusse C, Gascon L, Prichard R. (1993). Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship whit plasma disposition kinetics. J Vet PharmacolTherap; 16: 38-47.
- 19) Ley 18.611. Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica. Disponible en: <https://legislativo.parlamento.gub.uy/temporales/leytemp7254109.htm>. Fecha de consulta: 01, 03, 2019.
- 20) McKellar Q., Galgrath E., Baxter P. (1993). Oral absorption and bioavailability of fenbendazole in the dog and the effects of concurrent ingestion on food. J. Vet. Pharmacol. Therap. 13: 223-227.
- 21) Mosier D. (2007). Vascular Disorders and Thrombosis. En: McGavin M, Zachary J. Pathologic basis of veterinary disease. 4a ed. Missouri, Mosby, p. 63-99.
- 22) Petry H. (2005). Metabolismo energético. En: Engelhardt W., Breves G. Fisiología Veterinaria. Zaragoza, Acribia, p. 461-472
- 23) Rubio J y Boggio JC. (2009). Farmacología veterinaria 2ª ed. Córdoba, Ed. EDDUCC, 727 p.
- 24) Sánchez Bruni S, Sallovitz J, Álvarez N, Lanusse C. (2002). Antiparasitarios internos. En: Botana, Landoni , Martin-Giménez, Farmacología y terapéutica veterinaria. Ed. Mc graw-Hill. Interamericana, Madrid p. 517-544.

25) Sánchez Bruni, S, Jones D, Mckellar Q (2006). Pharmacological approaches towards rationalizing the use of endoparasitic drugs in small animals. *J Vet PharmacolTherap*; 29: 443-457.

26) Saumell C, Fuse L, Monfrinotti A, Iglesias L, Steffan P, Fiel C. (2006). Evaluacion de Ricobendazole vía oral en caninos. *Revista de Medicina Veterinaria*; 87: 160-165.

27) SENASA Argentina
(<http://webs.satlink.com/usuarios/l/labover/e/e7608.htm>). Fecha de consulta: 02,02 2019.

28) Stokol T, Randolph J, Nachbar S, Rodi C, Barr SC (1997). Development of bone marrow toxicosis after albendazole administration in a dog and cat. *Journal of American Veterinary Medical Association*; 210: 1753-1756.

29) Sumano HS y Ocampo L.(2006). *Farmacología veterinaria 3ª ed.*, México, Ed. Mc Graw-Hill. Interamericana, 1082 p.

30) Townsend L, Wise D. (1990). The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitology Today*; 6: 107-112.

31) Wagner Millet Wtt (1943). Benzimidazole. *Organic Syntheses* 2: 65.

32) Wallum E. (1998). Acute oral toxicity. *Environ Health Perspect*; 106 (Suppl 2): 497-503.

33) Wu Z, Razzak M, Tucker I, Medlicott N. (2005). Physicochemical Characterization of Ricobendazole: Solubility, Lipophilicity, and ionization characteristics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 94: 983-993.

