

**Caracterización Farmacológica del Albendazol
Sulfóxido y de sus Enantiómeros en Ovejas y Ratas.
Análisis del Metabolismo Ruminal**

Tesis Doctoral

Bettencourt Preto Sebastião Capece
Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología
Universidad Autónoma de Barcelona

Barcelona, 2001

**Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología
Universidad Autónoma de Barcelona**

**Caracterización Farmacológica del Albendazol
Sulfóxido y de sus Enantiómeros en Ovejas y Ratas.
Análisis del Metabolismo Ruminal**

Memoria que presenta

Don Bettencourt Preto Sebastião Capece

para optar al grado de

Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona

La **Dra. Margarita Arboix Arzo**, catedrática del Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona y el **Dr. Carles Cristòfol Adell**, profesor Asociado del Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona

Certifican:

Que el trabajo titulado ***Caracterización Farmacológica del Albendazol Sulfóxido y de Sus Enantiómeros en Ovejas y Ratas. Análisis del metabolismo ruminal***, del que es autor el Licenciado **D. Bettencourt Preto Sebastião Capece**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al título de *Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona*.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Bellaterra a 30 de julio de 2001

Dra. Margarita Arboix Arzo

Dr. Carles Cristòfol Adell

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto del Gobierno Español CICYT (AGF98-1036-CO2-01) y por la Agencia Española de Cooperación Internacional.

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a los doctores Margarita Arboix y Carles Cristòfol, directores de este trabajo, por sus múltiples enseñanzas, buenos consejos, aliento, confianza y incontable tiempo dedicado, añadido a las dificultades de lengua que han soportado durante estos años.

A Marga, que ha depositado su confianza desde el lejano año de 1994, prestándome todo el apoyo que me ha sido necesario durante estos años y para quien no encuentro palabras de gratitud.

A Carles, que pacientemente me ha soportado durante estos años, apoyándome siempre que ha sido necesario.

Requiere especial atención la multitud de horas y fines de semana invertidos por el gran Paco durante la fase experimental, añadido a la contribución para el buen humor que siempre nos hace la Vanguardia que nos trae cada día. Asimismo va mi especial agradecimiento a Montserrat Martínez, por su paciencia, atención y disponibilidad, simpatía y amistad.

A la buena Estrella de los viernes que siempre ha sabido hacer buena compañía en el momento y lugar exacto.

A todo el personal de la unidad de Farmacología, Terapéutica y Toxicología Veterinaria por soportar las constantes molestias que cada día he causado. De modo particular agradezco a Glòria, que ha sido una verdadera hermana científica y a Georgina que ha sido una buena amiga y compañera de despacho.

Al personal del servicio de las granjas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, por atender mis innumerables peticiones sin reservas.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, por el suministro de los enantiómeros separados lo que permitió la realización de parte de los experimentos de esta

tesis.

Al Dr. Sergio Calsamiglia por haber permitido y apoyado la realización de parte de los experimentos en su laboratorio.

Al personal de la unidad de Anatomía y Embriología por su incansable dedicación y apoyo. Sin ellos este trabajo no habría sido posible. Gracias a los doctores Jesús Ruberte, Ana Carretero y Marc Navarro por todo el tiempo que me habeis dedicado.

Al Dr. Félix García, por las horas que tuvo que soportar en el quirófano, y a la Dra. Yvonne Espada por su disponibilidad en realizar las ecografías.

A Rubén Pérez por su paciencia en enseñarme la técnica de cirugía fetal que ha hecho posible el estudio del paso placentario en ovejas.

Al personal del Hospital Clínico Veterinario por su paciencia, y prestarme su material siempre que ha sido necesario.

Aos meus pais que me concederam a vida e sempre me deram o seu amor, permitindo deste modo ser o que hoje sou. Aos meus irmaos, pelo seu infinito apoio a pesar de não entenderem o que fazia durante estes anos.

A Nilsa, que desinteresadamente apoiou-me bastante durante os anos da minha formação universitária, e sempre animou-me a prosseguir com todo amor, confiança e amizade.

A Anna, Carles y Pitu, que durante estos años han sido verdaderos *companys*, estando siempre a mi lado en los momentos difíciles y felices.

A Josep Pastor, mi hermanito que ha sido un verdadero soporte cuando más lo necesitaba durante estos años.

A Raquel, Barbara, y Celia, por su amistad y apoyo.

A los inolvidables amigos del CCU y *Esp lai*, por haber compartido varios momentos felices y difíciles en estos años. En especial a José Luis (Lucifer), Conchita, José Ángel, Enric, Xavier (Satan), Fran, Cristina, Pedro y Mireia (La gran vecina).

Un especial agradecimiento va a Aurora (la Andaluza), Augusta (la italiana), Gregorio, Xavi Serra, Teresa (La Vasca), a David (por la excelente portada) y a Pilar Brazis por su infinita simpatía.

Aos doutores Yussuf Adam, Mohamed Harun, Luis Neves, Carlos Lopes Pereira, que sempre me dispensaram o seu apoio nos anos subsequentes a licenciatura, aconselhando e integrando-me profesionalmente, e que durante estes anos nunca cansaram de encorajar-me.

Um agradecimento especial ao Dr. José Cardoso pelo metical que sempre me enviou cada dia mantendo-me informado.

A Carla Santos (Kaka), a grande amiga e companheira de formação que sempre esteve ao meu lado.

A todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a la consecución de esta tesis.

Parte de esta memoria ha dado lugar a siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

- Capece, B. P. S., Castells, G., Pérez, F., Arboix, M., Cristòfol, C. (2000). Pharmacokinetics behaviour of albendazole sulphoxide enantiomers in male and female sheep. *Veterinary Research Communications* **24** 339-348.
- Capece, B. P. S., Calsamiglia, S., Castells, G., Arboix, M., Cristòfol, C. (2001). Effect of ruminal microflora on the biotransformation of netobimin, albendazole, albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide enantiomers in an artificial rumen. *Journal of Animal Science* **79** 1288-1294.
- Capece, B. P. S., Pérez, R., Andaluz, A., Pérez, F., García, F., Castells, G., Arboix, M., Cristòfol, C. (2001). Placental transfer of albendazole sulphoxide enantiomers in sheep. *Veterinary Journal*. **In Press**.
- Capece, B. P. S., Calsamiglia, S., Castells, G., Arboix, M., Cristòfol, C. (2000). Albendazole sulphoxide metabolism by cow ruminal flora in artificial rumens. 8th european association for Veterinary Pharmacology and Toxicology Congress. Jerusalém. Israel.
- Capece, B. P. S., Castells, G., Pérez, F., Rojas, T., Arboix, M., Cristòfol, C. (2000). 10 day rat embryo concentrations of albendazole sulfoxide and sulfone after oral administration of albendazole sulfoxide. 8th european association for Veterinary Pharmacology and Toxicology Congress. Jerusalém. Israel.
- Capece, B. P. S., Calsamiglia, S., Castells, G., Arboix, M., Cristòfol, C. (2000). Metabolismo de netobimin por la flora ruminal del bovino en rumen artificial. IX Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-Toxicología. Tandil-Argentina.

Aos meus pais
A Nilsa

Índice

Introducción	1
1. Generalidades.....	3
2. Albendazol sulfóxido	5
2.1. Características fisicoquímicas	6
2.2. Mecanismo de acción	7
2.2.1. Inhibición del metabolismo energético.....	7
2.2.2. Inhibición de la polimerización de la tubulina	7
2.3. Actividad antihelmíntica	9
2.4. Farmacocinética	10
2.4.1. Vías de administración.....	10
2.4.2. Absorción y distribución	10
2.4.3. Metabolismo	13
2.4.3.1. Metabolismo gastrointestinal	13
2.4.3.2. Metabolismo hepático.....	14
2.4.4. Excreción.....	15
2.5. Reacciones adversas	17
2.6. Factores que modifican la disposición del fármaco en el organismo.....	18
2.6.1. Alimentación.....	18
2.6.2. Parasitismo.....	21
2.6.3. Edad	22
2.6.4. Sexo	22
2.6.5. Gestación	24
2.6.6. Especie.....	25
3. Características cinéticas y dinámicas de los fármacos racémicos	26
3.1. Comportamiento farmacocinético de los enantiómeros	27
3.2. Comportamiento farmacodinámico de los enantiómeros.....	30

Objetivos.....	30
Material y Métodos	35
1. Reactivos	37
2. Fármacos	37
2.1. Substancias estándares	37
2.2. Formulaciones	38
3. Soluciones.....	38
4. Aparatos.....	39
4.1. Material de laboratorio en general.....	39
4.2. Sistema de fermentadores artificiales	39
4.3. Sistema cromatográfico	40
5. Animales	40
5.1. Ovejas.....	40
5.1.1. Estudio farmacocinético del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas machos y hembras.....	40
5.1.2. Estudio del paso placentario del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas.....	41
5.2. Vacas	41
5.3. Ratas.....	41
5.3.1. Estudio del perfil cinético y embriotóxico del ABZSO y de sus enantiómeros en ratas gestantes.....	41
5.3.2. Estudio farmacocinético del ABZSO y de cada uno de sus enantiómeros en ratas no gestantes	42
6. Diseño experimental	42
6.1. Estudio farmacocinético del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas machos y hembras	42
6.2. Estudio in vitro del efecto de la flora ruminal sobre el metabolismo del NTB, ABZ, ABZSO y de los enantiómeros del ABZSO	43
6.3. Estudio del paso placentario de los enantiómeros del ABZSO en ovejas.....	44
6.3.1. Procedimiento quirúrgico	44

6.3.2. Estudio cinético	45
6.4. Estudio del perfil cinético del ABZSO y de sus enantiómeros administrados en forma racémica y por separado a ratas	45
6.5. Estudio del paso placentario del ABZSO en ratas. Análisis del perfil cinético de la madre gestante	46
6.6. Análisis de la toxicidad del ABZSO en embriones de rata	46
7. Métodos analíticos empleados	47
7.1. Extracción de los analitos de las muestras de plasma o embrión	47
7.2. Extracción de los analitos del contenido ruminal	48
7.2.1. Preparación de las muestras	48
7.2.2. Extracción en fase sólida	48
7.3. Cuantificación cromatográfica de los analitos en las muestras	49
7.3.1. Determinación del NTB, ABZ, ABZSO y ABZSO ₂ en fluido ruminal, plasma y embriones	49
7.3.2. Separación y cuantificación de los dos enantiómeros del ABZSO	49
7.4. Estudio de las malformaciones esqueléticas	50
8. Análisis farmacocinético	51
9. Análisis estadístico	52
9.1. Estudio farmacocinético del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas machos y hembras	52
9.2. Estudio del metabolismo ruminal de NTB, ABZ, ABZSO y de sus enantiómeros	53
9.3. Estudio del paso placentario del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas	53
9.4. Estudio de las concentraciones embrionarias de ABZSO en ratas	53
9.5. Estudio de la toxicidad del ABZSO en embriones de ratas	54
Resultados.....	55
1. Análisis de la cinética plasmática de los enantiómeros del ABZSO en ovejas machos y hembras	57
2. Estudio del efecto de la flora ruminal en la biotransformación del NTB, ABZ, ABZSO y de sus enantiómeros en rúmenes artificiales	61

3. Estudio del paso placentario de los enantiómeros del ABZSO en ovejas	65
4. Estudio de la disposición a nivel embrionario del ABZSO y sus enantiómeros en ratas....	68
5. Estudio de la embriotoxicidad y teratogenia del ABZSO en ratas	72
6. Estudio del perfil cinético de los enantiómeros de ABZSO en ratas.....	79
Discusión	85
1. Caracterización farmacocinética del ABZSO y sus enantiómeros en rumiantes.....	87
2. Estudio del paso placentario del ABZSO y sus enantiómeros en ovejas y ratas. Análisis de la embriotoxicidad en la rata	94
3. Estudio farmacocinético de albendazol sufóxido racémico y de sus enantiómeros administrados por separado en ratas	102
Conclusiones	107
Bibliografía.....	111

Abreviaturas

BZD: Benzimidazol

NTB: Netobimín

ABZ: Albendazol

OXI: Oxibendazol

ABZSO: Albendazole sulfóxido

rac-ABZSO: Forma racémica del albendazol sulfóxido

ABZSO-total: Sumatorio de los dos enantiómeros de albendazol sulfóxido

(+)-ABZSO: Enantiómero positivo del albendazol sulfóxido

(-)-ABZSO: Enantiómero negativo del albendazol sulfóxido

ABZSO₂: Albendazol sulfona

ABZSO₂NH₂: Amina del albendazol sulfona

ABZSONH₂: Amina del albendazol sulfóxido

2OH-ABZSO: Metabolito hidroxilado de albendazol sulfóxido

2OH-ABZSO₂: Metabolito hidroxilado de albendazol sulfona

3OH-ABZSO: Metabolito hidroxilado de albendazol sulfóxido

3OH-ABZSO₂: Metabolito hidroxilado de albendazol sulfona

6OH-ABZSO: Metabolito hidroxilado de albendazol sulfóxido

6OH-ABZSO₂: Metabolito hidroxilado del albendazol sulfona

CH₃-ABZSO: Metabolito metilado de albendazol sulfóxido

Cit. P450: Citocromo P450

FMO: Flavino-monooxigenasas

NADPH: Nicotin-adenosin-dinucleótido-fosfato reducido

T_{max}: Tiempo en lo cual se alcanza la concentración plasmática máxima

C_{max}: Concentración plasmática máxima

MRT: Tiempo medio de residencia

AUC: Area bajo la curva de las concentraciones respecto al tiempo

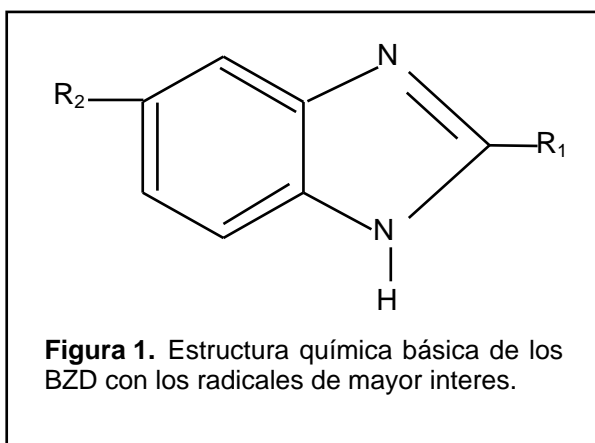
t_{1/2}: Semivida de eliminación plasmática

CMC: Carboximetilcelulosa.

Introducción

1. Generalidades

La frecuente presencia de parásitos en los animales de las explotaciones ganaderas conlleva grandes problemas sanitarios e importantes pérdidas económicas. La necesidad de controlar estas parasitosis ha comportado el desarrollo de numerosas moléculas con actividad antihelmíntica, como los imidotiazoles, tetrahidropirimidinas, benzoimidazoles y probenzoimidazoles, los cuales se han utilizado con éxito, tanto en medicina humana como en veterinaria. De todos estos antiparasitarios, los benzoimidazoles (BZD) son uno de los grupos con mayor espectro de actividad, con una elevada efectividad y seguridad.



Estos fármacos son polvos blancos cristalinos, con puntos de fusión ligeramente altos, baja solubilidad en agua, alta solubilidad en medio orgánico, y con naturaleza anfotérica. Los BZD presentan una estructura bicíclica compuesta por un anillo de benceno que se fusiona en las posiciones 4 y 5 de un anillo imidazólico formando el anillo benzoimidazólico (Townsend y Wise,

1990). Los distintos BZD difieren en los sustituyentes que se encuentran en la posición 2 y 5 del anillo benzoimidazol (Figura 1). De acuerdo con estos sustituyentes, los BZD antihelmínticos se pueden clasificar en:

- *Metilcarbamatos*: albendazol, albendazol sulfóxido, parbendazol, mebendazol, flubendazol, ciclobendazol, oxibendazol, luxabendazol, fenbendazol y oxfendazol.
- *Tiazólicos*: tiabendazol, cambendazol.
- *Tiol halogenatos*: triclabendazol

Su baja solubilidad en el agua es la principal limitación para su formulación, lo que obliga a su preparación en forma de suspensiones, pastas o gránulos para su administración por vía enteral. Para compensar su baja solubilidad, se han sintetizado fármacos probenzoimidazoles como el tiofanato, febantel y netobimin, que presentan una mayor solubilidad en agua, y su

actividad depende de su conversión en el organismo a un BZD metilcarbamato o etilcarbamato (Lanusse y Prichard, 1993).

En general se administran por vía oral o intraruminal en forma de suspensiones o pastas a los animales poligástricos; y por vía oral en forma de suspensiones o en comprimidos a los animales monogástricos. El tratamiento de los animales poligástricos se realiza con la administración de una dosis única, mientras que el de los monogástricos se realiza en pautas de dosificación múltiple y frecuentemente se preparan piensos medicados. Posteriormente estos son absorbidos mayoritariamente a nivel del abomaso y del intestino delgado. En rumiantes esta absorción es más lenta que en los monogástricos. Este retraso puede ser causado por las diferencias existentes en la velocidad de disolución del fármaco, debidas a las características morfofisiológicas del tracto gastrointestinal entre estos dos tipos de animales.

Una vez absorbidos, los BZD llegan a la circulación donde presentan un grado de unión a las proteínas plasmáticas superior al 50%, con un volumen de distribución relativamente alto (Lanusse y Prichard, 1993), alcanzando tejidos bien irrigados y periféricos. La mayor parte de estos fármacos son metabolizados en el hígado en dos fases, dando lugar a metabolitos con actividad antihelmíntica e inactivos (Gottschall y cols., 1990). Algunos, también son metabolizados en el tracto gastrointestinal (Lanusse y Prichard, 1993). Los metabolitos formados en el hígado en la primera fase son productos resultantes de procesos oxidativos e hidrolíticos que, en la fase siguiente, son glucurono o sulfatoconjugados, incrementando su polaridad. Estos BZD y sus metabolitos son excretados por vía biliar y urinaria.

Estos fármacos presentan una buena actividad antihelmíntica frente a nemátodos, céstodos y tremátodos, gracias a su capacidad para inhibir la polimerización de la tubulina parasitaria durante la mitosis. También presentan un efecto inhibitor del metabolismo energético de los parásitos (Lacey, 1990). Han demostrado ser eficaces contra formas adultas y larvas de nemátodos, céstodos y tremátodos. También se ha visto que presentan en muchos casos una cierta acción ovocida.

Todos los BZD poseen una actividad antihelmíntica similar, pero presentan diferencias en la potencia y en el espectro de acción frente a los diferentes grupos de parásitos. Probablemente estas variaciones en el efecto antihelmíntico sean debidas a diferencias en la disponibilidad del

fármaco en el organismo y por tanto a su concentración en el lugar de acción (McKellar y Scott, 1990).

La seguridad de estos fármacos cuando son administrados a los animales es generalmente elevada. Su baja solubilidad y el hecho de que se administran por vía oral hacen difícil el estudio de la toxicidad aguda cuando son administrados por la vía recomendada. Sin embargo, cuando se administran por vía oral durante el primer tercio de gestación pueden desarrollar toxicidad embrionaria, posiblemente derivada de su capacidad de unión a la tubulina durante el desarrollo embrionario (Lacey, 1990). Esta toxicidad puede llegar a provocar malformaciones congénitas, e incluso, la muerte del embrión. En humanos se han observado algunas reacciones adversas no muy frecuentes asociadas al tratamiento con BZD, como efectos gastrointestinales de carácter leve, alopecia reversible, aumento de las transaminasas del suero, proteinuria y neutropenia (Reuter y cols., 2000; Venkatesan, 1998).

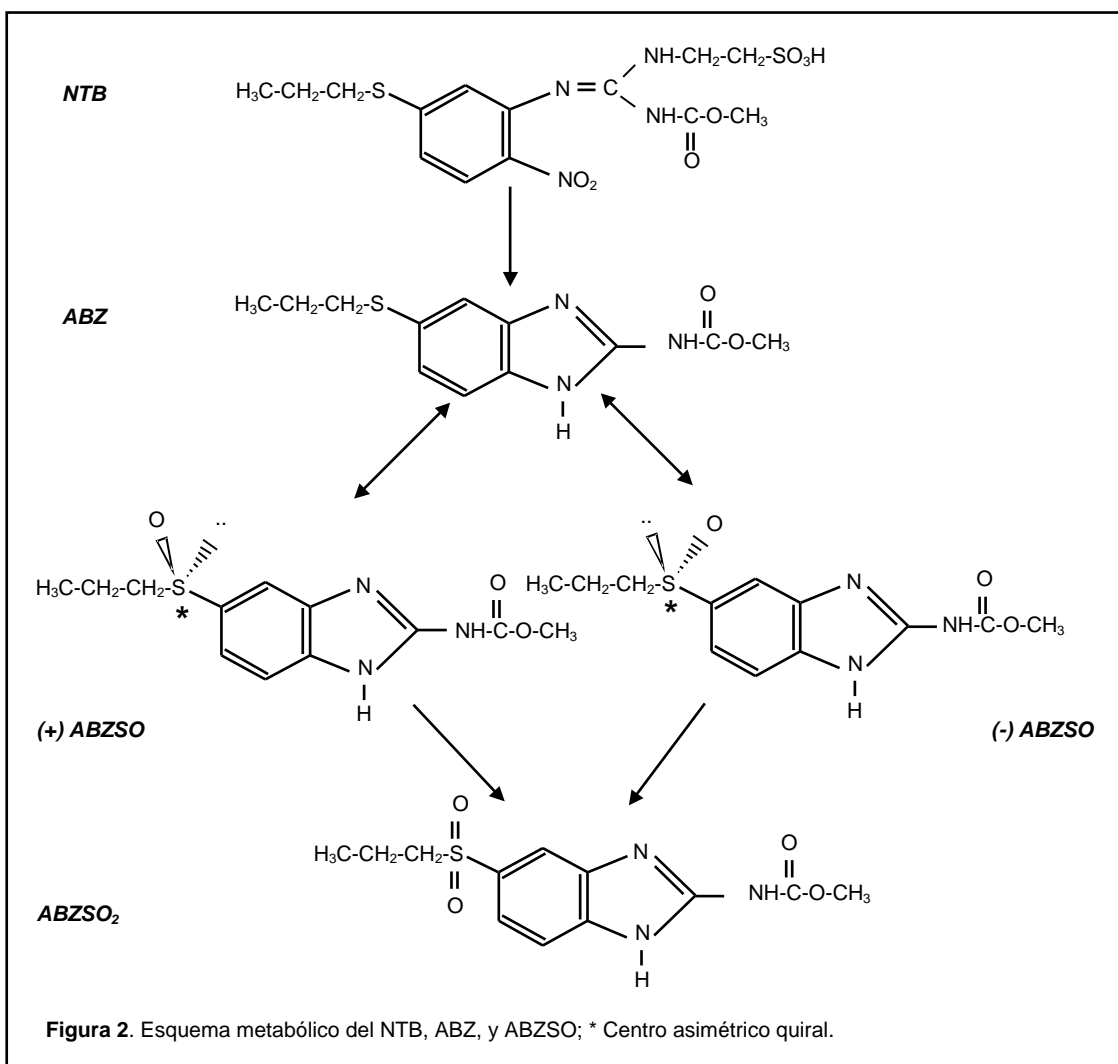
2. Albendazol sulfóxido

De los BZD actualmente comercializados, el albendazol (ABZ) es el que mayor eficacia antiparasitaria presenta. Parte de su eficacia es atribuida a la acción de su metabolito albendazol sulfóxido (ABZSO), que presenta una actividad similar al ABZ. Recientes estudios han demostrado que esta molécula presenta una buena actividad antihelmíntica, pero al igual que otros BZD tiene capacidad de causar trastornos durante el desarrollo embrionario (Cristòfol y cols., 1997b; Delatour y cols., 1984).

La molécula del ABZSO presenta en su estructura química un centro asimétrico quiral en la posición del átomo de azufre, dando lugar a la existencia de dos enantiómeros, el positivo ((+)-ABZSO) y el negativo ((-)-ABZSO) en función de su actividad óptica (Figura 2). Estos enantiómeros pueden presentar diferente comportamiento farmacológico. En la actualidad no existen prácticamente estudios respecto al perfil farmacológico de los enantiómeros de ABZSO.

2.1. Características fisicoquímicas

El ABZSO, metil-[5-(propilsulfenil)-1H-benzimidazol-2-il] carbamato ($C_{12}H_{15}N_3O_3S$), también llamado ricobendazol, se usa directamente como antihelmíntico de amplio espectro, aunque, también aparece como metabolito del albendazol (ABZ) y de su profármaco, netobimin (NTB) (Figura 2). Tiene un peso molecular de 281.33 g/mol, y es una molécula más polar que el ABZ,



pero todavía posee una alta liposolubilidad. Su pKa es de 7.8 y, al igual que otros de su grupo, posee una naturaleza anfotérica, aumentando su solubilidad cuando se encuentra en un medio

ácido.

2.2. Mecanismo de acción

El ABZSO, así como otros BZD, actúan sobre los parásitos a través de dos mecanismos: inhibiendo el metabolismo energético del parásito e inhibiendo la polimerización de la tubulina de los microtúbulos de los parásitos (Lacey, 1988; 1990).

2.2.1. Inhibición del metabolismo energético

Los BZD inhiben el metabolismo energético de los parásitos gracias a su capacidad de actuar sobre los sistemas enzimáticos y sobre la captación de sus fuentes energéticas. Esta interferencia provoca una disminución en la disponibilidad de la energía necesaria para el funcionamiento normal de los órganos vitales de los parásitos, lo cual conduce a un agotamiento de sus fuentes energéticas provocando su muerte.

Diferentes estudios han demostrado la acción de estos fármacos sobre ciertas enzimas parasitarias tales como la fumarato-reductasa (Criado-Fornelio y cols., 1990), la malato-deshidrogenasa (Tejada y cols., 1987), la succinato-deshidrogenasa (Boczon, 1976) y sobre las enzimas del ciclo del fosfoenolpiruvato (Rahman y Bryant, 1977). También se ha observado que estos disminuyen la captación de la glucosa por parte del parásito (Criado-Fornelio y cols., 1990; McCracken y Lipkowitz, 1990; McCracken y Stillwell, 1991). La interferencia en el metabolismo energético de los parásitos también fue observada al incubar *Echinococcus granulosus* en presencia de ABZSO, el cual causaba una disminución de las reservas de glucógeno del parásito (Pérez-Serrano y cols., 1994).

2.2.2. Inhibición de la polimerización de la tubulina

El ABZSO, así como otros BZD metilcarbamatos, presentan una elevada afinidad por la tubulina de las células de los parásitos impidiendo la polimerización de ésta. Su unión a la tubulina durante el crecimiento de los microtúbulos provoca la inhibición de la mitosis (Lacey,

1990). Tal inhibición puede producir una desaparición de los microtúbulos citoplasmáticos de los parásitos, causando una interrupción de la migración de los orgánulos intracelulares, bloqueando de esta manera el transporte de los orgánulos secretores. En estudios *in vitro* se ha observado que diferentes BZD (mebendazol, fenbendazol, oxicarbendazol, albendazol y albendazol) inhibían de forma competitiva la unión colchicina-tubulina en la fracción citosólica de *Trichinella spiralis*, indicando que estas sustancias presentan afinidad por el mismo locus de unión de la colchicina a la tubulina (Criado-Fornelio y cols., 1990; Jiménez-González y cols., 1991). Alteraciones inmunohistoquímicas de dicha proteína también han sido observadas en incubaciones de tubulina de protoescoléx de *Echinococcus granulosus* en presencia de ABZ y ABZSO por separado o en combinación (Pérez-Serrano y cols., 1995). Sin embargo, en estudios realizados por Pérez-Serrano y cols. (1994) se observó que las mayores alteraciones a nivel ultraestructural en protoescoléx ocurrían al incubar conjuntamente el ABZ y ABZSO, lo que pone de relieve el efecto sinérgico de dichas moléculas. En un estudio similar, se observó que dichas alteraciones suponían una vacuolización del citoplasma distal, un aumento del número de mitocondrias, un incremento de autofagosomas y un aumento de depósitos lipídicos (Casado y cols., 1996). Aunque tanto el ABZSO como el ABZ inhiben el desarrollo parasitario, el ABZ es el que presenta mayor actividad antiparasitaria (Lacey y cols., 1987; Lubega y Prichard, 1991a). Estas diferencias de actividad entre el ABZ y el ABZSO pueden ser debidas a la mayor afinidad del ABZ por los parásitos en comparación con el ABZSO, como fue observado en estudios realizados con *Moniezia spp* (Álvarez y cols., 1999). Las diferencias en las características lipofílicas de los fármacos afectarían al poder de penetración de estos al interior del parásito a través de sus membranas, siendo el ABZ el que presenta mayor lipofilia y como tal presenta mayor poder de penetración.

Estos fármacos también presentan afinidad por la tubulina de los mamíferos (Lacey y cols., 1987). Aunque la afinidad por la tubulina de los parásitos se haya mostrado superior a la de la tubulina de los mamíferos, es a este mecanismo de acción al que se le atribuye el efecto teratógeno de los BZD. Por su mecanismo de acción, que implica una perturbación de la estructura y de la función microtubular durante la división mitótica, cabe esperar un desarrollo de anomalías embrionarias y fetales cuando se administra ABZSO a hembras gestantes, ya que en estas fases existe gran cantidad de divisiones mitóticas y migraciones celulares en las que interviene la tubulina como factor principal.

2.3. Actividad antihelmíntica

El ABZSO es activo frente a nemátodos, céstodos y tremátodos, manifestando una buena actividad tanto en las formas adultas como en las larvales de los parásitos (Campbell, 1990).

En estudios realizados *in vitro*, se ha podido observar que el ABZSO es efectivo contra *Echinococcus multilocularis* (Ingold y cols., 1999), *E. granulosus* (Pérez-Serrano y cols., 1994) y además contra protozoos como el *Encephalitozoon spp* (Ridoux y Drancourt, 1998).

Al administrar ABZSO, se ha podido observar que este fármaco es eficaz frente a infestaciones por *E. granulosus* en ratones (Pérez-Serrano y cols., 1997), conejos (Erzurumlu y cols., 1998), y ovejas (Deger y cols., 2000), frente a infestaciones por *Trichinella spiralis* a nivel enteral y parenteral en ratones (López-García y cols., 1997). Cuando es administrado conjuntamente con levamisol, el ABZSO es efectivo contra parásitos como *Ostertagia spp* y *Trichostrongylus spp* en ovejas (Anderson y cols., 1991a; 1991b).

Después de la administración de NTB o ABZ, el ABZSO es el único antihelmíntico activo que llega a la sangre, por lo cual la actividad antihelmíntica contra parásitos sistémicos en estos tratamientos es atribuida principalmente a la acción del ABZSO. En esta línea, hay que destacar que después de la administración oral del ABZ, el ABZSO es activo contra *Muellerius capillaris* en cabras (Cabaret, 1991), larva de *Taenia solium* en humanos (Sotelo y Jung, 1998), *Wuchereria bancrofti* en humanos (Ottesen y cols., 1999) y *Dictyocaulus viviparus* en terneras (Osman y cols., 1996). Además en asociación con ABZ tiene acción contra *Fasciola hepática* en ovejas (Richards y cols., 1987).

Recientemente, algunos estudios *in vitro* han demostrado que el metabolito sulfonado del ABZSO (ABZSO₂) posee una ligera actividad antiparasitaria frente a *Echinococcus multilocularis* (Ingold y cols., 1999) y *Encephalitozoon spp* (Ridoux y Drancourt, 1998). Sin embargo se carece de estudios referentes a la actividad farmacológica de este metabolito cuando se administra directamente a los animales.

2.4. Farmacocinética

2.4.1. Vías de administración

El ABZSO se formula para su administración por vía oral, intraruminal o subcutánea. Debido a la importancia del metabolismo gastrointestinal en la disposición y efectividad de los BZD y a su mala solubilidad, la principal vía para la administración de los BZD es la oral o la intraruminal.

En rumiantes jóvenes, la administración intraruminal presenta una mejor disposición y eficacia que la oral. Estas diferencias pueden ser debidas al paso directo del fármaco hasta el abomaso, a través de la existencia de la gotera esofágica, acelerándose el paso del fármaco por el tracto digestivo.

2.4.2. Absorción y distribución

Como se ha descrito anteriormente, la vía de administración de elección del ABZSO es generalmente la oral. Una vez administrado este se disuelve en los fluidos gastrointestinales y es absorbido hasta alcanzar la circulación general. El grado de disociación del fármaco y su liposolubilidad condicionan el grado de absorción, así como las concentraciones plasmáticas y tisulares que alcanzará.

Cuando se administra a animales monogástricos, la absorción es bastante rápida comparado con la administración a animales poligástricos. En un estudio realizado en ratones a los que se les administró por vía oral ABZSO, se pudo observar que este alcanzaba concentraciones máximas a las 0.41 (0.28) h (López-García y cols., 1997), sin embargo, en ovejas a las que se les administró por vía oral ABZSO, se pudo observar que la absorción se efectuaba de una forma lenta, alcanzando las concentraciones máximas alrededor de las 10 h postadministración (Delatour y cols., 1990b). Valores similares también fueron observados en cabras tras la administración de ABZSO por vía oral (Benchaoui y cols., 1993). Sin embargo, cuando se administró por vía subcutánea a terneros, el fármaco se absorbió con rapidez alcanzando las concentraciones máximas alrededor de las 4 h postadministración (Lanusse y cols., 1998).

Cuando se valora la absorción del ABZSO en los animales rumiantes hay que considerar la baja solubilidad que presenta este tipo de moléculas a pH superiores a 5, que son los que se observan a nivel del rumen. Esta ligera acidez, retarda la absorción del fármaco en el tracto digestivo, lo que puede comportar diferencias cinéticas entre la administración oral y la intraruminal (Hennessy y cols., 1989). En estudios realizados en ovejas, a las que se les administró ABZ por vía oral e intraruminal, se observó que la disposición plasmática de sus metabolitos era mayor cuando el fármaco era administrado por vía intraruminal con valores de área bajo la curva de concentraciones plasmáticas (AUC) del ABZSO de 44.63 y 32.74 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ para vía intraruminal y oral, respectivamente (Swarnkar y cols., 1998). Valores similares también fueron observados al comparar la administración intraabomasal e intraruminal del mismo fármaco en ovejas (Steel y Hennessy, 1999). Estas diferencias podrían ser consecuencia de la baja solubilidad ruminal y del posible metabolismo ruminal que se comenta en apartados posteriores.

El ABZSO, así como los otros BZD, posee un elevado grado de unión a las proteínas plasmáticas. En un estudio realizado *in vitro* en que se incubó el ABZSO en plasma de ovejas, se observó que la unión a las proteínas plasmáticas era mayor en el plasma de las hembras que en el de los machos con valores de un 87% y un 50%, respectivamente (Cristòfol y cols., 1998). Hennessy y cols. (1989) observaron, *in vivo*, al administrar ABZ, que la unión de sus metabolitos se modificaba con el tiempo postadministración, pudiendo alcanzar niveles desde un 47% en las primeras horas hasta un 87% de unión pasadas las 24 h. Esto podría ser debido a un aumento de la relación plasmática de concentraciones $\text{ABZSO}_2/\text{ABZSO}$ con el tiempo y al hecho de que el ABZSO_2 se une en más de un 70% a las proteínas plasmáticas como lo observó Cristòfol y cols. (1998). En bovino, se observó que el ABZSO se une tanto a la albúmina en un 34% como a la α_1 -glicoproteína en un 32% (Jung y cols. 1998).

El ABZSO presenta una buena distribución a los tejidos. Cristòfol y cols. (2001) observaron que después de la administración intravenosa del fármaco a terneros, éste se distribuía rápidamente a los tejidos presentando un volumen de distribución de 0.8 L/kg. Tras la administración intravenosa, el ABZSO alcanza las mucosas digestivas, los líquidos ileal y ruminal, el hígado y el pulmón presentando concentraciones significativas hasta pasadas las 48 h postadministración (Lanusse y cols., 1998).

En estudios relativos a análisis de residuos del ABZSO en tejidos de ternera y oveja, se ha podido constatar que el ABZSO alcanza tejidos bien irrigados como el hígado y el riñón, y también se ha detectado en músculo y en grasa (EMEA, 1996). Estos datos sugieren que el fármaco tiene una amplia distribución a tejidos bien irrigados y a tejidos periféricos.

Un efecto muy importante a la hora de valorar la disposición del ABZSO cuando se administra a rumiantes, es el efecto de trampa iónica que se produce en el abomaso. Se ha observado que tras el tratamiento con ABZ, el metabolito formado en el hígado (ABZSO) retorna al tracto gastrointestinal (Hennessy, 1993). La tasa de retorno está en función de la relación de pH que hay entre la sangre, el rumen y el abomaso, y del pKa de la molécula (Lanusse y Prichard, 1993). Estudios realizados en terneras tratadas con ABZSO han demostrado que el gradiente de pH existente entre los fluidos digestivos y el plasma favorece la excreción del ABZSO y de sus metabolitos desde la sangre al tracto digestivo, y en especial al abomaso (Lanusse y cols., 1998). Esta excreción se hace generalmente por transporte pasivo y a favor del gradiente de concentraciones del fármaco libre y no ionizado, concentrándose el fármaco del lado donde el grado de disociación es superior. En el caso del ABZSO, sustancia con un pKa entorno al 7.8, se concentrará en el medio con mayor acidez (Lanusse y cols., 1993a; Lanusse y Prichard, 1993). El intercambio entre la circulación sistémica y el abomaso, a través de la mucosa, es más importante cuando se produce desde la sangre al lumen del abomaso, que no a la inversa (Hennessy, 1993). Este efecto da como resultado un aumento de las concentraciones de ABZSO a nivel del tracto digestivo y un aumento del tiempo de contacto del fármaco con los parásitos gastrointestinales incrementando así su eficacia. Por otro lado, el intercambio bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el plasma contribuye a aumentar los tiempos de residencia del fármaco en el organismo mediante una circulación enteroplasmática. No obstante, este intercambio puede verse afectado por cambios del pH abomasal causados por una infestación parasitaria (Álvarez y cols., 1997). Estos autores observaron en un estudio realizado en ovejas parasitadas y no parasitadas a las que se administró ABZ, que los animales parasitados presentaban un aumento del pH abomasal; este aumento disminuía el gradiente de pH entre el plasma y el abomaso, disminuyendo el grado de retención del fármaco en el abomaso. Como consecuencia se observó una disminución de las concentraciones de los metabolitos del ABZ en el abomaso en relación con las observadas en el plasma, lo cual podría afectar a la eficacia contra los parásitos a nivel del tracto gastrointestinal.

2.4.3. Metabolismo

Después de la administración del ABZSO, independientemente de la vía, éste es metabolizado en el hígado y en el tracto digestivo. Ambas vías metabólicas han demostrado tener una importancia primordial en la disposición en el organismo del ABZSO. En este punto se analizan las características principales de cada una de estas vías metabólicas y sus implicaciones en el perfil cinético del ABZSO.

2.4.3.1. Metabolismo gastrointestinal

Los BZD son metabolizados en los fluidos gastrointestinales y en los enterocitos (Lanusse y Prichard, 1993; Villaverde y cols., 1995). En rumiantes, el rumen además de actuar como reservorio de los fármacos administrados por vía oral, participa en su metabolismo. Algunos estudios han puesto de relieve la importancia del metabolismo del ABZSO en los fluidos gastrointestinales (Lanusse y cols., 1992a; Virkel y cols., 1999). Estos autores observaron en estudios *in vitro* y en condiciones anaerobias que cuando se incubaba el ABZSO en los fluidos ruminal e ileal de ovejas y terneros, éste era oxidado a ABZSO₂ y/o reducido a ABZ. Esta capacidad metabólica del rumen también fue observada en estudios *in vitro* incubando ABZ (que se oxidaba a ABZSO), y NTB (que se nitroreducía a ABZ) (Lanusse y cols., 1992a; 1992b). Estos autores observaron que los procesos de reducción eran más eficientes que los de oxidación y que los fluidos ruminales eran más eficientes que los fluidos ileales. Esta última diferencia podría ser debida al elevado potencial reductor que presenta el rumen (Yokoyama y Johnson, 1988). Este predominante potencial reductor sugiere que, tanto el NTB como el ABZSO, son fuentes de ABZ al nivel gastrointestinal, y como éste presenta una alta actividad antihelmíntica superior al ABZSO (Lubega y Prichard, 1991b; Pérez-Serrano y cols., 1997), se justificaría la alta eficacia antihelmíntica del tratamiento tanto con NTB como con ABZSO.

La biotransformación gastrointestinal tiene un papel importante en la eficacia de los BZD. En estudios realizados por Steel y Hennessy (1999) se observó que frente a parásitos gastrointestinales resistentes a los BZD como son *Trichostrongylus columbriformis* y *Haemonchus contortus*, la administración intraabomasal del ABZ era más eficaz que la administración intraruminal. Estas diferencias en la respuesta antihelmíntica estaban

relacionadas con diferencias en el perfil cinético entre las dos vías. En el mismo estudio se observó que la administración de ABZ por vía ruminal presentaba una AUC plasmática del metabolito ABZSO (44.9 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) superior al de la administración abomasal (32.2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). Las AUC abomasales de este metabolito también eran superiores en la administración intraruminal. Sin embargo, la disposición del ABZ en el fluido abomasal era mayor cuando se administraba por esta vía, lo que justificaría las diferencias en la eficacia antihelmíntica entre estas dos vías de administración (Steel y Hennessy, 1999). Dicha eficacia podría ser debida al efecto sinérgico entre el ABZ y el ABZSO.

Al nivel intestinal también se ha podido observar metabolismo del ABZ a ABZSO en los microsomas de enterocitos, con la participación de las enzimas flavino-monooxigenasa (FMO) y del sistema citocromo P450 (Cit. P450). En ratas se observó que el ABZ era captado por los enterocitos (Villaverde y cols., 1992) y era metabolizado a ABZSO (Villaverde y cols., 1995).

2.4.3.2. Metabolismo hepático

La vía principal del metabolismo hepático del ABZSO es la sulfonación. Esta reacción metabólica es el resultado de una oxidación del átomo de azufre del ABZSO por los enzimas hepáticos. Esta metabolización ocurre en un proceso lento e irreversible, donde participan principalmente los enzimas del sistema Cit. P450 (Souhaili El-Amri y cols., 1988). En los microsomas hepáticos de ratas previamente tratadas con ABZ durante tres días consecutivos (Arteiza y cols., 2000) se pudo observar un efecto inductor del metabolismo del ABZSO por parte del ABZ. Este fenómeno también fue estudiado en cabras por Benoit y cols. (1992). Estos autores observaron que la formación del ABZSO₂ aumentaba con la administración de dosis sucesivas de ABZ a las cabras. Este aumento se acompañaba de una disminución de las concentraciones plasmáticas del ABZSO, lo que sugería que la inducción metabólica causada por el ABZ afectaba principalmente los procesos de sulfonación.

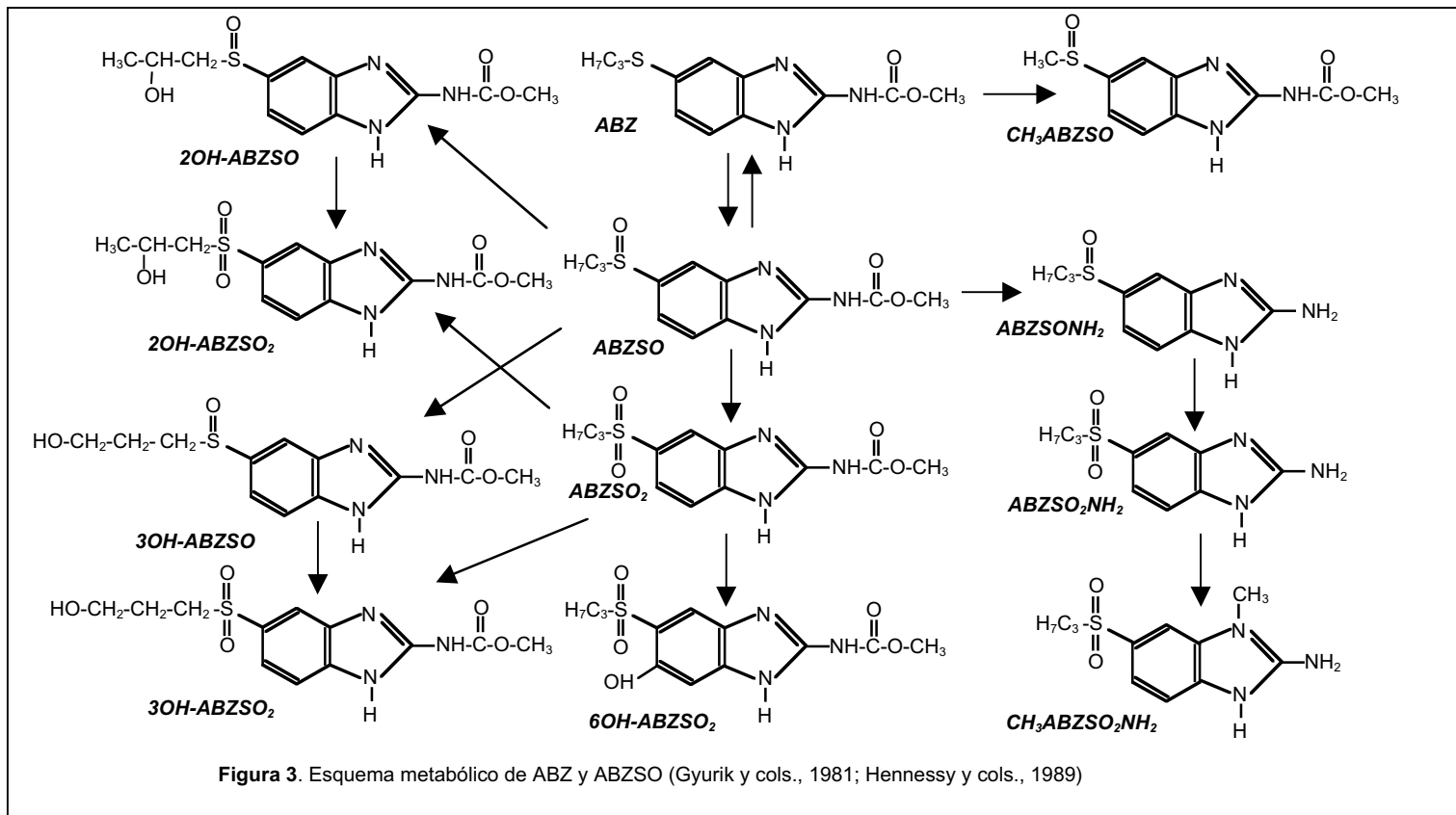
Como se ha comentado anteriormente, el ABZSO aparece también como producto del metabolismo hepático del ABZ. Varios estudios han demostrado que el ABZ es metabolizado a ABZSO en un proceso de sulfoxidación en el cual participan los enzimas oxidativos microsomales NADPH dependientes del sistema FMO y del sistema Cit. P450. Esto fue

observado en microsomas hepáticos de ratas (Moroni y cols., 1995; Solana y cols., 2000), cerdos (Souhaili El-Amri y cols., 1987), ovejas (Galtier y cols., 1986), terneras (Lanusse y cols., 1993b; Virkel y cols., 2000) y humanos (Rawden y cols., 2000).

Por otra parte se han descrito otras reacciones metabólicas de menor importancia y que se producen con el ABZ o el ABZSO dando una serie de metabolitos que se excretan con la bilis y la orina en bajas proporciones. Estos metabolitos (Figura 3) pueden ser el resultado de otras vías metabólicas como la aril-hidroxilación del núcleo, la hidrólisis del carbamato, o las N-metil-acetilaciones (Galtier, 1991). Además, estos productos también pueden aparecer como metabolitos glucuronoconjugados que son excretados tanto por vía urinaria como por vía biliar.

2.4.4. Excreción

La excreción de ABZSO y sus metabolitos se realiza principalmente por vía renal y en menor grado por vía biliar. En general, los metabolitos más polares se excretan por vía renal (entorno al 60% en rumiantes), y los menos polares se excretan como conjugados en forma de sulfato o glucuronoconjugados por vía renal y biliar. Gyurik y cols. (1981) y Hennessy y cols. (1989) observaron que por vía biliar se excretaba entre el 14 y 20% de los metabolitos después de la administración del ABZ a ovejas. Estos autores también constataron que el metabolito hidroxilado de ABZSO se excretaba rápidamente por esta vía antes de la sulfonación. Sin embargo, como la oxidación y la hidroxilación producen metabolitos suficientemente polares, éstos pueden ser excretados rápidamente por vía renal. En ovejas, terneras, ratas y ratones se observó que los metabolitos del ABZ, principalmente los derivados de ABZSO y ABZSO₂, representados en la Figura 3, se excretaban por esta vía (Gyurik y cols., 1981; Hennessy y cols., 1989). Esta excreción del ABZSO por vía renal también fue observada en humanos y ratas cuando el ABZSO fue la molécula administrada (Domínguez y cols., 1995).



2.5. Reacciones adversas

El ABZSO es un fármaco que presenta un amplio margen terapéutico como todos los BZD. No hay datos en la bibliografía sobre su toxicidad aguda o crónica. Al igual que el resto de los BZD, presenta una baja solubilidad en agua, lo que imposibilita los estudios de toxicidad en animales de laboratorio tras la administración recomendada (enteral), ya que al aumentar la dosis el fármaco no se disuelve y no se absorbe.

Como se ha comentado anteriormente el ABZSO es el principal producto presente en la sangre tras el tratamiento de animales con ABZ o NTB; estos tratamientos cuando se aplican a hembras durante el primer tercio de gestación han demostrado una alta actividad embriotóxica y teratógena, causando numerosas malformaciones externas, esqueléticas, y vasculares a diversos niveles en los fetos (Cristòfol y cols., 1997b; Navarro y cols., 1998; 1999). Estas malformaciones fueron atribuidas al ABZSO por su capacidad de atravesar la barrera placentaria y alcanzar elevadas concentraciones en embriones de ratas (Cristòfol y cols., 1997b) y plasma de fetos de ovejas (Cristòfol y cols., 1995), siendo esta molécula la que representa el 90% de las concentraciones plasmáticas de los animales tratados con NTB y ABZ.

El ABZSO ha demostrado tener capacidad para interferir en la mitosis y, consecuentemente, causar malformaciones tal como se observó en embriones de terneras y ratas (Piscopo y Smoak, 1997). Estudios *in vitro* con cultivos de células embrionarias de rata han demostrado que tanto el ABZ como el ABZSO poseen una actividad citotóxica, siendo la toxicidad del ABZ 50 veces superior a la del ABZSO (Whittaker y Faustman, 1991). En cambio, en estudios *in vivo* se ha observado que el ABZSO y el ABZ presentaban un grado de embriotoxicidad similar después de la administración individual de cada uno de ellos (Delatour y cols., 1981). Por otra parte, la acción del ABZ y el ABZSO sobre la polimerización de la tubulina también podría ser la causa de las malformaciones generadas por estos tratamientos. En la embriogénesis, se producen numerosas migraciones celulares donde intervienen principalmente los microtúbulos. La acción de dichos fármacos sobre el crecimiento de estos microtúbulos podría desarrollar migraciones anómalas que daría como resultado las malformaciones (Navarro y cols., 1999;

Whittaker y Faustman, 1991).

2.6. Factores que modifican la disposición del fármaco en el organismo

La disposición de los fármacos en el organismo de los animales puede ser influenciada por diversos factores. En el caso de los BZD, hay estudios que han puesto en evidencia la influencia de la alimentación, parasitismo, edad y sexo sobre la cinética y eficacia antiparasitaria de estos fármacos. En esta sección se analiza con detalle cada uno de los factores y como pueden éstos modificar el perfil cinético del ABZSO.

2.6.1. Alimentación

La alimentación desempeña un papel importante en los procesos fisiológicos que ocurren en el tracto gastrointestinal. Los cambios en la dieta pueden modificar tanto las condiciones basales de pH en el tracto gastrointestinal, como la velocidad del tránsito digestivo. En los animales monogástricos, al poseer una velocidad de tránsito gastrointestinal de los alimentos relativamente alta, los cambios de pH en el tracto digestivo puede que no sean tan críticos para la disposición de los fármacos como lo es el propio tránsito digestivo.

Otro factor importante relacionado con la alimentación es la posible interacción entre los fármacos y los componentes de la dieta. En un estudio realizado en cerdos, con diferente tipo de alimentación, a los que se administró una misma dosis de ABZ por vía oral, se observaron diferencias en la disposición plasmática de los metabolitos del ABZ (Álvarez y cols., 1996). Estos autores sugieren que los animales alimentados con pasto son los que mayor disposición plasmática presentaban, seguido de los animales alimentados con pasto y concentrados y por último los que solamente recibían concentrados. Sin embargo las concentraciones máximas se alcanzaban antes en los alimentados con concentrados que con los alimentados con pasto.

El caso de los animales poligástricos es un poco más complejo. Las características anatómicas del tracto gastrointestinal de estos animales hacen que la disposición de los fármacos administrados por vía enteral tenga una serie de elementos especiales a considerar, como son el alto volumen del contenido digestivo, el lento tránsito digestivo, y la alta concentración de

microorganismos que mantienen un cierto equilibrio fisiológico y condicionan el pH del medio mediante sus fermentaciones, teniendo poder metabólico sobre algunos fármacos. Todas estas características pueden verse modificadas por cambios en la dieta, alterando consecuentemente la biodisponibilidad de los fármacos. Por una parte el rumen actúa como reservorio de los fármacos que son administrados por vía enteral y por otra puede biotransformarlos. También se sabe que el tiempo de permanencia de los fármacos en el rumen depende de la velocidad de vaciado ruminal que está condicionada por el tipo, cantidad y frecuencia de ingesta de los alimentos (Yokoyama y Johnson, 1988).

La dieta es, probablemente, el factor que más influye sobre las proporciones de las distintas especies de microorganismos que se encuentran en el rumen y que pueden estar implicadas en la fermentación (Yokoyama y Johnson, 1988). Por ejemplo, cuando hay un cambio brusco hacia una dieta rica en concentrados, se observa una sucesión de cambios en la población microbiana del rumen durante el periodo de adaptación de forma específica en aquellas bacterias que producen y utilizan el lactato. Las bacterias que utilizan el lactato, sensibles al ácido, son reemplazadas por otras que utilizan lactato y son resistentes al ácido. Durante el periodo de adaptación hay una incapacidad de las especies que emplean el lactato para incrementar lo suficiente su número y evitar la acumulación de lactato producido por otras poblaciones bacterianas, lo que lleva a su acumulación en el rumen, con el consecuente descenso del pH (Yokoyama y Johnson, 1988). Como la solubilidad del ABZSO aumenta al disminuir el pH, el incremento de la acidez ruminal debido a la alimentación con concentrados aumentaría su disolución en los fluidos gastrointestinales. Esto facilitaría la absorción y consecuentemente, incrementaría de sus concentraciones plasmáticas y su disposición tisular.

Por otra parte, el volumen de alimentos consumidos también puede modular el tránsito del contenido ruminal, condicionando el tiempo de permanencia del fármaco y su disolución en los fluidos ruminales (Hennessy, 1993). En animales en ayunas, el tránsito gastrointestinal se retrasa, prolongándose el tiempo de disolución y absorción de las moléculas. En ovejas y terneros mantenidos en ayunas antes de la administración oral del ABZ, se observaron valores de tiempo medio de residencia y tiempo de vida media de eliminación superiores a los observados en animales alimentados *ad libitum* (Lifschitz y cols., 1997; Sánchez y cols., 1997; Singh y cols., 1999). Por otra parte, el consumo de grandes cantidades de alimentos, particularmente pastos verdes, induce a un rápido tránsito gastrointestinal, incrementando la

velocidad de absorción de la droga (Hennessy, 1993).

La influencia del tipo de dieta sobre la acidez ruminal y el metabolismo del ABZSO ha sido descrita en ovejas por Virkel y cols. (1999). Estos autores observaron que los fluidos ruminales procedentes de animales alimentados con concentrados presentaban mayor grado de acidez y mayor capacidad reductora del ABZSO a ABZ que los fluidos procedentes de animales alimentados con heno. Por otra parte, Sánchez y cols. (1999) observaron que la dieta influenciaba la disposición plasmática de los metabolitos de ABZ, siendo los animales alimentados con concentrado los que presentaban mayores concentraciones plasmáticas de los metabolitos del ABZ en relación a los animales alimentados con pasto natural. Varios estudios han demostrado variaciones en el perfil plasmático de los metabolitos del ABZ producto de cambios en la dieta en cerdos (Álvarez y cols., 1996), en ovejas (Singh y cols., 1999) y en terneros (Sánchez y cols., 1999). Efectos similares también fueron observados para los metabolitos de fenbendazol en terneros y búfalos (Sanyal y cols., 1995).

La condición nutricional también puede afectar el metabolismo y el perfil cinético de los BZD. Sánchez y cols. (1996) observaron como la condición nutricional afectaba negativamente el sistema NADPH del que dependen las oxidasas hepáticas, inhibiendo el metabolismo del ABZSO. Este retraso implicaba una mayor permanencia de ABZSO y ABZSO₂ en el organismo en animales mal nutridos. Estas variaciones en el metabolismo pueden afectar tanto la eficacia como la toxicidad del fármaco.

En resumen, factores como el ayuno, alimentación, y condición corporal, pueden influenciar la disposición plasmática del fármaco, a través de la modificación del pH, la ionización gástrica, y la absorción. Por lo tanto animales enfermos que pueden fácilmente presentar anorexia, disminución de volumen de agua ingerida, etc., pueden presentar niveles plasmáticos más bajos, así como menos distribución tisular y modificaciones en el tiempo de espera de las formulaciones administradas.

2.6.2. Parasitismo

El parasitismo es un factor influyente en la disponibilidad de un fármaco pudiendo asimismo repercutir en su eficacia, independientemente de la vía de administración. Una infestación parasitaria a nivel gastrointestinal, puede afectar la funcionalidad de la mucosa y el pH gastrointestinal condicionando la disolución y la absorción de los fármacos.

En el hígado, la infestación parasitaria también puede afectar la actividad enzimática de los hepatocitos o causar una obstrucción de los conductos biliares. Una disminución de los enzimas que participan en el metabolismo del ABZSO o una inhibición de la eliminación de sus metabolitos por obstrucción de los conductos biliares, puede modificar el perfil cinético del fármaco en el organismo. Galtier y cols. (1991) observaron que la reacción de sulfonación del ABZSO en los hepatocitos de ovejas infectadas con *Fasciola hepática*, era muy reducida ya que se producía una disminución significativa de los niveles de actividad del Cit. P450. Sin embargo, la actividad de las FMO no se veía afectada manteniéndose prácticamente los procesos de sulfoxidación del ABZ. Asimismo y tras un tratamiento a humanos con equinococosis, se observó que el MRT y el AUC del ABZSO eran mayores que en los individuos sanos (Cotting y cols., 1990). Estos valores elevados fueron atribuidos a la obstrucción que el parásito causa en los conductos biliares. En principio, este aumento del MRT y de la AUC comportaría un aumento de efectividad antiparasitaria a nivel sistémico debido al contacto durante un prolongado periodo de tiempo de mayores concentraciones del fármaco con el parásito.

Álvarez y cols. (1997) observaron, en ovejas, que la infestación parasitaria afectaba la disposición plasmática y abomasal de ABZSO, ABZSO₂ y ABZ después de la administración intraruminal del ABZ. Los animales infectados natural o artificialmente con *Haemonchus contortus*, presentaban valores de AUCs plasmáticas del metabolito ABZSO mayores (64 µg.h.ml⁻¹ para infección artificial y 79.3 µg.h.ml⁻¹ para natural) que en los animales no infectados (41.8 µg.h.ml⁻¹). El aumento de los niveles plasmáticos del ABZSO en los animales infectados iba acompañado de una disminución de las concentraciones abomasaes; esta podría ser debida al incremento del pH abomasal causada por los parásitos. Como consecuencia del aumento del pH, disminuye la disociación del fármaco en los fluidos

gastrointestinales disminuyendo con esto la distribución del fármaco hacia el tracto gastrointestinal, haciendo que las concentraciones plasmáticas sean superiores mientras que las abomasales sean inferiores en los animales infectados que en los sanos. Esto podría llevar a la disminución de la actividad antiparasitaria a nivel gastrointestinal y al aumento de la misma a nivel sistémico.

2.6.3. Edad

La edad de los animales puede influenciar los procesos metabólicos de muchos xenobióticos. Factores como el pH gástrico, la motilidad gastrointestinal, el área de absorción, la población microbiana y el consumo de la leche, son determinantes en los procesos de absorción de los fármacos desde el tracto gastrointestinal en neonatos. No obstante, la evolución de la composición corporal y de la actividad hepática y renal con la edad pueden llevar a importantes variaciones en la distribución de los fármacos, presentando diferencias farmacológicas entre los animales jóvenes y adultos. En general, los individuos recién nacidos presentan déficit de los enzimas que participan en el metabolismo inespecífico hepático. Este déficit puede implicar una significativa reducción de la velocidad metabólica y por tanto un incremento del tiempo de permanencia de los fármacos en el organismo. Por ejemplo, las vías metabólicas como la glucuronoconjugación prácticamente no existen en animales recién nacidos, y las oxidativas están muy limitadas. Por ello, algunos fármacos con tiempo de vida media corto, pueden incrementar el valor de este parámetro en animales recién nacidos, con el consiguiente riesgo de toxicidad. No obstante, en un estudio realizado en ovejas de diferentes edades a las que se les administró NTB, ABZ y ABZSO, no se observaron diferencias en los parámetros cinéticos del ABZSO y ABZSO₂ (McKellar y cols., 1995; McKellar y cols., 1993). Esta falta de diferencias podría ser debida al hecho de que las vías metabólicas de los ovinos sean precoces (Galtier, 1991), no habiendo diferencias metabólicas entre los animales adultos y jóvenes. En cuanto a los animales viejos, aunque algunas vías metabólicas en ellos no sean funcionales, se carece de estudios al respecto.

2.6.4. Sexo

Los parámetros cinéticos de cualquier fármaco, y en particular de los BZD utilizados como

antihelmínticos en la práctica veterinaria, pueden presentar ciertas diferencias en función del sexo de los animales. De hecho, las hormonas sexuales, las proteínas plasmáticas, los ácidos grasos, el agua corporal, y la composición de algunos enzimas pueden variar entre animales machos y hembras. Estas variaciones pueden provocar cambios en el volumen de distribución, en la unión a proteínas plasmáticas y en el metabolismo hepático, causando variaciones en el perfil cinético del fármaco y de sus metabolitos, entre machos y hembras (Mulder, 1986). Estas diferencias han sido observadas por Cristòfol y cols. (1998) en ovejas tratadas con NTB. Estos autores observaron al incubar ABZSO en el plasma de ovejas, que la unión a las proteínas plasmáticas era mayor en las hembras que en el de los machos, con valores de un 87% y un 50%, respectivamente. Estos factores pueden afectar el volumen de distribución de las drogas lipófilas. En el mismo trabajo se observó que después de una administración oral del NTB, los parámetros cinéticos de eliminación del ABZSO y del ABZSO₂ presentaban diferencias significativas entre machos y hembras, siendo los machos los que las eliminaban más rápidamente. Estos autores sugieren que estas diferencias en la eliminación podrían estar relacionadas con diferencias en el metabolismo del ABZSO, teniendo en cuenta que este fármaco es metabolizado por el Cit. P450 y que la actividad de este enzima puede estar regulada por las hormonas sexuales.

Harris y cols. (1995) observaron en ratas machos un nivel relativamente más elevado que en hembras de una de las isoenzimas del Cit. P450 de la familia 3A (CYP3A), lo que podría llevar a una más rápida metabolización de los fármacos que utilizan estas vías metabólicas, y consecuentemente a una mayor velocidad de eliminación en machos frente a hembras.

Por otra parte, numerosos autores han observado como algunos enzimas que participan en el metabolismo hepático pueden ser modulados por las hormonas sexuales, existiendo mayor actividad en un sexo respecto al otro. En estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado como algunos isoenzimas del Cit. P450 son modulados por las hormonas sexuales (Dannan y cols., 1986; Waxman y cols., 1985). También es posible que hormonas como la testosterona, actúen como inductores enzimáticos de algunas vías metabólicas (Witkamp y cols., 1983). En microsomas hepáticos de ratas, Kamataki y cols. (1983) detectaron diferencias entre sexos relacionadas con las características y la actividad catalítica del Cit. P450.

También se ha visto que existen diferencias en la estructura anatómica entre machos y

hembras (Harris y cols., 1995). Por ejemplo los machos pesan más que las hembras. Esta diferencia en el peso produce diferencias en la composición muscular, el flujo sanguíneo, y en la cantidad de agua corporal. Además, las hembras tienen una tendencia a poseer un mayor porcentaje de grasa corporal.

2.6.5. Gestación

El proceso de gestación, comporta una serie de cambios en el funcionamiento y composición corporal de los animales. Por ejemplo, a nivel del sistema gastrointestinal, se verifica una disminución de las secreciones ácidas y de la motilidad intestinal, afectando por una parte la velocidad de tránsito de los fármacos administrados por vía oral, y por otra parte, el grado de solubilidad y absorción causado por variaciones en la secreción de los jugos gástricos que conllevan modificaciones del pH gástrico. El sistema circulatorio también se ve afectado por el aumento del flujo sanguíneo y débito cardíaco lo que incrementa la velocidad de distribución y aclaramiento renal, pudiendo con esto disminuir el tiempo de permanencia de los fármacos en el organismo. Asimismo el aumento del agua corporal que se produce en las hembras gestantes, provoca significativos cambios en la pauta de distribución de los fármacos en el organismo.

Una de las principales alteraciones que se observan en el curso de la gestación, es la composición de las proteínas plasmáticas, se produce un aumento de las globulinas y disminución de las albúminas. Incluso en valores porcentuales se puede decir que hay una disminución de la cantidad total de proteínas plasmáticas. Esta disminución en los niveles de proteínas plasmáticas podría ser debido al aumento del agua corporal y del volumen plasmático que se produce durante la gestación. Algunos estudios han demostrado que la síntesis de las proteínas se mantiene, sin embargo no es lo suficiente para compensar el incremento del volumen sanguíneo (Notarianni, 1990). La hipoproteinemia puede causar un aumento en la distribución tisular, debido al incremento en la cantidad de fármaco libre, lo que causaría cambios en los efectos farmacológicos (cinéticos y dinámicos) de los fármacos administrados durante la gestación. Además de estos cambios funcionales en la hembra gestante, también se observa la presencia de nuevos compartimentos como son los tejidos y fluidos fetales, y placentarios. Estos nuevos compartimentos pueden afectar la distribución de los fármacos en el organismo.

También, se producen cambios hormonales como son el incremento de los niveles de progesterona. Es conocido que el metabolismo hepático a nivel del Cit. P450 puede verse modificado por la presencia de progesterona que puede interactuar con el metabolismo de los fármacos. Numerosos autores han descrito modificaciones en la cinética de los fármacos durante la gestación, así el fenobarbital, presenta una depuración más rápida durante la gestación, debido a una posible inducción de la actividad metabólica (Högstedt y cols., 1985), y la teofilina es eliminada más lentamente debido a una posible inhibición de su metabolismo hepático (Gardner y cols., 1987).

En la literatura, hay pocos estudios sobre el efecto de la gestación en la disponibilidad de los BZD. En un estudio realizado por Cristòfol y cols. (1997a) en ovejas a las que se les administró NTB en diferentes periodos de gestación, no se observaron diferencias en la disponibilidad del ABZSO y de su metabolito el ABZSO₂. No obstante, estos autores señalan que el complicado metabolismo de estas sustancias en los rumiantes, podría enmascarar las posibles modificaciones provocadas por la gestación.

2.6.6. Especie

La capacidad del organismo para metabolizar y eliminar los xenobióticos puede variar con la especie, estando condicionados por las características morfofisiológicas de los animales. Numerosos ejemplos corroboran estas diferencias y los fármacos BZD no son la excepción al respecto. En un estudio realizado en humanos, ratas, y perros después de la administración de una dosis de 10 mg/kg de ABZ por vía oral se observaron diferencias en los parámetros farmacocinéticos del ABZSO y ABZSO₂ (Delatour y cols., 1991a). Estos autores encontraron diferencias en las concentraciones máximas alcanzadas, siendo las más altas las observadas en ratas, seguidas de los perros y por último los humanos. Asimismo las AUCs del ABZSO fueron de 39.2, 10.6, y 3.5 µg·h/mL para rata, perro y humanos, respectivamente. Al comparar el perfil cinético del ABZSO obtenido después de la administración de una misma dosis de ABZ a cerdos (Álvarez y cols., 1996) y a terneras (Sánchez y cols., 1999) alimentados con pasto, se observaron diferencias en los valores obtenidos de las AUCs, siendo estos significativamente mayores para cerdos (23.7 ± 3.43 µg·h/mL) que para terneras (12.7 ± 1.20 µg·h/mL).

Las diferencias entre especies también pueden ocurrir al nivel del metabolismo. En estudios realizados *in vitro* en los que se incubó el NTB, ABZ, y ABZSO en fluido ruminal e ileal procedente de terneras y ovejas, se observó que la capacidad oxidativa era mayor en terneras que en ovejas, sin embargo, los fluidos gastrointestinales procedentes de ovejas presentaban mayor capacidad reductora (Lanusse y cols., 1992a; Lanusse y cols., 1992b). Asimismo, las diferencias relacionadas con la especie también se observaron en el metabolismo hepático del ABZ (Lanusse y cols., 1993b). Estos autores observaron que la capacidad oxidativa a nivel de los microsomas hepáticos de la oveja era mayor que de la ternera. Estas diferencias metabólicas pueden ocurrir tanto en el proceso de sulfoxidación como en la sulfonación. Delatour y cols. (1991b) observaron que al administrar ABZ por vía oral a ovejas y a terneras, la relación de las AUCs entre ABZSO/ABZSO₂ diferían presentando valores de 3.2 y 0.6 para ovejas y terneras, respectivamente. Similares diferencias también fueron encontradas entre animales monogástricos a los que se les administró una misma dosis de ABZ, observándose una relación de las AUCs entre ABZSO/ABZSO₂ de 5.6 para ratas, 10.0 para perros y de 7.3 para humanos (Delatour y cols., 1991a). En definitiva la capacidad metabólica de los enzimas hepáticos puede variar significativamente entre las diferentes especies animales, afectando de esta manera el perfil cinético de los BZD y sus metabolitos.

3. Características cinéticas y dinámicas de los fármacos racémicos

Aproximadamente uno de cada cuatro agentes terapéuticos son comercializados como mezclas racémicas sin tener en cuenta las características farmacológicas diferenciales de los enantiómeros. Varios son los estudios que han demostrado la existencia de diferencias en el comportamiento farmacológico entre los enantiómeros de algunos fármacos como la warfarina, el verapamilo, la mefenitoina o el propanolol (Levy y Boddy, 1991). Estas diferencias pueden ser debidas a una enantioselectividad en los procesos farmacocinéticos o en los procesos farmacodinámicos (Hutt y Tan, 1996; Williams y Lee, 1985).

3.1. Comportamiento farmacocinético de los enantiómeros

Los enantiómeros pueden presentar entre ellos diferencias en su comportamiento farmacocinético, en el ámbito de absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Para muchos fármacos, la absorción desde el tracto gastrointestinal es un proceso pasivo, que solamente depende del gradiente de concentraciones del fármaco y no se ve afectado por la quiralidad de las moléculas (Nerurkar y cols., 1992). No obstante, cuando la absorción se realiza mediante transportadores, es posible que estos transportadores tengan mayor afinidad por uno u otro enantiómero según cual sea su estructura espacial (Williams, 1989).

La enantioselectividad a nivel de la afinidad del sustrato para los enzimas responsables de los procesos metabólicos ha sido observada por algunos autores, comportando diferencias en la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato y consecuentemente diferencias en la velocidad de formación de los metabolitos (Nerurkar y cols., 1992). Dicha selectividad se acentúa si la similitud entre el enzima y el sustrato en el centro asimétrico quiral es mayor para uno de los enantiómeros (Williams y Lee, 1985). En la literatura hay varios estudios que describen la enantioselectividad durante los procesos de sulfoxidación por las enzimas del sistema Cit. P450 y de las FMO (Light y cols., 1982; Waxman y cols., 1982). Estos autores analizaron el 4-tolil-etil sulfide como sustrato de las enzimas del sistema Cit. P450 y FMO proveniente de ratas, y observaron que las FMO catalizaban preferentemente la formación del (R)-(+)-sulfóxido mientras que el Cit. P450 catalizaba preferentemente la formación del (S)-(-)-enantiómero.

La glucuronoconjugación de los enantiómeros de carprofeno por los microsomas hepáticos de ratas, también es un proceso enantioselectivo, siendo la del R-enantiómero tres veces superior al isómero análogo (Maire-Gauthier y cols., 1998).

La enantioselectividad también se ha observado a nivel de la excreción, ya que pueden participar transportadores (Williams, 1989). En caballos, se observó que la tasa de excreción biliar del metabolito glucuronoconjugado del R-carprofeno era mayor que la del S-carprofeno y era de más del 70% (Maire-Gauthier y cols., 1998; Soraci y cols., 1995). En un estudio

realizado en humanos a los que se les administró bisoprol fueron observadas diferencias tanto en la depuración renal como en la metabólica de sus enantiómeros (Horikiri y cols., 1998). Estos autores observaron valores para la depuración renal de 6.4(1.6) y 7(1.6) L/h para el negativo y positivo, respectivamente, y valores de 3.2 (0.1) y 4.2(0.2) L/h para la depuración metabólica. Esto comporta diferencias en el perfil cinético entre cada uno de los enantiómeros, como se ha observado para los enantiómeros del carprofeno (Mckellar y cols., 1994; Taylor y cols., 1996) o del bisoprol (Horikiri y cols., 1998).

Diferentes autores sugieren que las FMO y el Cit. P450 son sistemas enzimáticos que serían enantioselectivos produciendo el (+) o el (-)-ABZSO respectivamente, a partir del ABZ. Asimismo es posible que la formación del ABZSO₂ desde el ABZSO catalizado por el Cit. P450, pueda favorecer al (-)-ABZSO. Esto fue observado en estudios realizados *in vitro*, con microsomas hepáticos de rata (Moroni y cols., 1995; Solana y cols., 2000), de ternera (Virkel y cols., 2000) y con microsomas de intestino de rata (Redondo y cols., 1999). En estos estudios se sugiere que las FMO producen predominantemente el (+)-ABZSO mientras que las isoenzimas CYP2C6 y CYP2A1 están más implicadas en la producción del (-)-ABZSO, lo que puede ser consecuencia de una diferenciación en la afinidad para el sustrato. Asimismo cuando se utilizó el metimazol como inhibidor metabólico del ABZ a nivel de las FMO en ratas, se observó que la producción del (+)-ABZSO disminuía (Solana y cols., 2000). También Lanusse y cols. (1993b) observaron algo similar en microsomas hepáticos de ovejas y terneros.

La enantioselectividad también ha sido sugerida a nivel de la sulfonación (Benoit y cols., 1992). Estos autores, cuando se administraban dosis sucesivas de ABZ a cabras, con intervalos de 24 h, detectaron que se producía un aumento de los niveles plasmáticos del ABZSO₂, al mismo tiempo que disminuían los niveles del (-)-ABZSO. Esta disminución del (-)-ABZSO, iba acompañada de un aumento de las AUCs del (+)-ABZSO, que alcanzaba un 76, 91, y 92% respecto al ABZSO total según las tres dosis crecientes administradas. Tal diferenciación podría ser causada por un posible consumo selectivo del (-)-enantiómero por parte del Cit. P450 en el proceso de la sulfonación, como sugieren Light y cols. (1982) y Waxman y cols. (1982).

En diferentes especies se ha observado que justo después de la administración del ABZ o ABZSO, las proporciones de los enantiómeros en la sangre permanecen en los primeros

momentos en forma racémica. Con el tiempo, estas proporciones se van modificando en función de la especie tratada. Estas diferencias en la producción y eliminación de los enantiómeros entre especies se ha constatado comparando tratamientos realizados en ovejas, humanos, ratas, perros y terneras. Al comparar las AUCs del (+)-ABZSO, después de la administración oral de ABZ a ratas, perros y humanos, se observó que en el hombre, perros y ratas éstas representaban un 80, 70 y 41 % del total del AUC del ABZSO, respectivamente (Delatour y cols., 1991a). Similares diferencias fueron encontradas al comparar ovejas y ratas, donde el (+)-enantiómero era mayoritario en ovejas, y en ratas predominaba el (-)-ABZSO (Delatour y cols., 1990a). Estas diferencias podrían ser debidas a diferencias en el perfil y composición de los enzimas hepáticos, responsables del metabolismo del ABZ y del ABZSO, entre las diferentes especies. En un estudio realizado en terneras a las que se administró ABZSO racémico por vía intravenosa se vio que el tiempo de vida media de eliminación del (-)-ABZSO era la mitad del correspondiente al (+)-ABZSO, con valores de 5.41 h para (+)- ABZSO y de 2.67 h para el (-)-ABZSO (Cristòfol y cols., 2000). Lo que sugeriría la implicación del metabolismo hepático en esta diferenciación.

Es conocido, como ya se ha descrito anteriormente, que existe un significativo metabolismo ruminal de NTB, ABZ y ABZSO. No obstante, se desconoce la existencia de procesos enantioselectivos durante la formación o consumo de los enantiómeros de ABZSO por lo que se requieren estudios al respecto.

Las diferencias en el perfil cinético de los enantiómeros del ABZSO, pueden afectar la actividad antiparasitaria del ABZSO, ya que la proporción de concentración de los enantiómeros por los tejidos parasitarios es similar a la sanguínea, como se ha observado con la *Fasciola hepática* (Álvarez y cols., 2000). Estas diferencias en la disponibilidad de los enantiómeros podría ser negativa si el enantiómero negativo, que es el que se encuentra en menor proporción, fuera más eficaz que el positivo, ya que el (+)-ABZSO es el que está presente en mayores proporciones en las especies animales susceptibles de un tratamiento (Delatour y cols., 1991a; b).

3.2. Comportamiento farmacodinámico de los enantiómeros

Numerosos estudios han puesto de relieve que la acción farmacológica y las reacciones adversas pueden diferir entre los enantiómeros (Williams, 1989). Este comportamiento puede ser debido a diferencias en la afinidad a las proteínas plasmáticas, a los receptores celulares o a la actividad intrínseca de cada uno de los enantiómeros; lo que puede comportar una respuesta tóxica cualitativa o cuantitativa diferente (Landoni y cols., 1997). Dichas diferencias, han sido descritas para muchos fármacos de uso veterinario como son el cloprostenol, verapamilo, ketamina y algunos anestésicos inhalatorios (Landoni y cols., 1997).

Las diferencias cualitativas se basan en el tipo de actividad que cada uno de los enantiómeros ejerce. Por ejemplo, la R-talidomida actúa como un sedante, mientras que la S-talidomida es un potente teratógeno (Landoni y cols., 1997). En ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Wilson, se observó que el uso del componente sintético racémico de la penicilamina causó neuritis óptica, mientras que el tratamiento con R-penicilamina no produjo estos efectos adversos (Walshe, 1992). Estudios realizados por Cox y cols. (1998) demostraron que el efecto farmacológico del enantiómero S(-)-bupivacaina era similar al de la forma racémica y no presentaba algunas de las reacciones adversas observadas cuando se administraba la forma racémica o el enantiómero R(-)-bupivacaina.

Cuantitativamente, los enantiómeros producen un mismo efecto biológico, pero con diferente potencia. Por ejemplo, White y cols. (1980) observaron que las reacciones adversas que aparecían después de la administración de R-ketamina eran mayores que las que producía la S-ketamina. En un estudio realizado en caballos en que se administraron por separado los enantiómeros de ketoprofeno, se vio que el S(+)-ketoprofeno era el más potente respecto al R(-)-ketoprofeno (Landoni y Lees, 1996).

Objetivos

Cuando se administran fármacos racémicos, sus enantiómeros pueden tener diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico. Por lo tanto, es posible que el uso de cada uno de ellos por separado proporcione ventajas en el campo de la terapéutica tales como, el aumento de la selectividad del perfil farmacológico del tratamiento, la potenciación del índice terapéutico, la disminución de las reacciones adversas y/o la reducción de las interacciones entre ellos.

Los BZD son fármacos que se administran generalmente por vía oral, y es conocido que son biotransformados a nivel gastrointestinal, en particular en los rumiantes. Estos factores, plantean el interés en conocer el proceso de biodegradación que el rac-ABZSO y sus enantiómeros sufren a nivel gastrointestinal y las repercusiones que este metabolismo puede tener en su eficacia y toxicidad.

Como el ABZSO es un fármaco racémico, el conocimiento del comportamiento farmacológico de sus enantiómeros cuando se administran en forma racémica o por separado, es importante, así, ajustar la posología que permita para mejorar la eficacia y disminuir su conocida toxicidad embrionaria y fetal

Partiendo de estas premisas se han fijado los siguientes objetivos:

1. Caracterización del perfil cinético del ABZSO en su forma racémica y de cada uno de sus enantiómeros. Para ello se estudiará:
 - La cinética plasmática del rac-ABZSO y de sus enantiómeros tras la administración oral del alendazol sulfóxido racémico en ovejas hembras y machos.
 - La biotransformación del ABZSO en los fluidos ruminales, mediante la utilización de rumenes artificiales.

2. Análisis de las implicaciones que la disposición de ambos enantiómeros en el organismo puede tener en la toxicidad embrionaria y fetal observada para el ABZSO. Para ello se estudiarán:
 - La cinética del rac-ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas gestantes y en sus respectivos fetos. Evaluando el transporte placentario, tras la administración del rac-ABZSO.
 - La cinética del rac-ABZSO y de sus enantiómeros en ratas gestantes tras la

administración del rac-ABZSO, analizando su acceso a los embriones.

- Los efectos embriotóxicos y teratogénicos de estos fármacos en ratas tras la administración por vía oral de tres dosis crecientes de rac-ABZSO.

3. Caracterización, en ratas, de la cinética de cada uno de los enantiómeros del ABZSO, tras la administración por separado de cada uno de ellos y también de la forma racémica.

Material y Métodos

1. Reactivos

Durante el procedimiento experimental fueron utilizados los reactivos siguientes:

- Metanol (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemania)
- Ácido clorhídrico (36%, SDS, Peypin, Francia)
- Acetato de etilo (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemania)
- Acetonitrilo (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemania)
- 2-Propanol (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemania)
- Amoníaco (SDS, Peypin, Francia)
- Ácido acético glacial (SDS, Peypin, Francia)
- Dihidrogenofosfato de sodio (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania)
- Rojo de Alizarina S (Panreac Química SA, Barcelona, España)
- Hidróxido de potasio (Panreac Química SA, Barcelona, España)
- Hidróxido de sodio (Panreac Química SA, Barcelona, España)
- Carboximetilcelulosa (CMC, Roig-Farma, SA; Barcelona, España)
- Glicerol (Scharlau, España)
- Alcohol etílico (Scharlau, España)
- Alcohol benzílico (Scharlau, España)

2. Fármacos

2.1. Sustancias estándares

- Albendazol (ABZ) suministrado por Hoeschst Marion Rossel (Frankfurt AM, Alemania), albendazol sulfóxido racémico (rac-ABZSO) y albendazol sulfona (ABZSO₂) suministrados por Schering-Plough (Animal Health Research, Kenilworth, NJ, USA), netobimín (NTB) suministrado por Essex Laboratorios (Barcelona, España) y Oxibendazol (OXI) suministrado por BASF Labiana (Terrassa, España). La pureza de todas las sustancias fue superior al 99%.
- Los enantiómeros del ABZSO separados fueron suministrados por el

Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valladolid (España). La pureza de estos enantiómeros fue superior al 98.5% para el (+)-ABZSO y al 96.4% para el (-)-ABZSO, y fue testada mediante una técnica cromatográfica de separación quiral descrita en el apartado de métodos.

2.2. Formulaciones

- ABZSO (Rycoben SC, 2.5%, Young's Animal Health, Leyland, Reino Unido). La proporción de los enantiómeros en la formulación fue de 50.2 (0.2)% para (+)-ABZSO y 49.8(0.2)% para (-)-ABZSO y fue calculada mediante la técnica de separación quiral por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
- Para la administración de los enantiómeros del ABZSO por separado se preparó una suspensión de 0.5 mg ABZSO /mL en CMC (1%):HCl (0.05 M) (50:50). Para administrar la forma racémica a ratas en el estudio farmacocinético se preparó una suspensión de 1 mg/mL en una solución similar a la descrita anteriormente
- Acetato de fluorogestona (Esponjas vaginales con 30 mg de FGA, Chronogest , Laboratorios Intervet S.A, Salamanca, España)
- Midazolam (0.5mg/kg; Dormicum , Productos Roche, S.A, Madrid, España)
- Fentanilo (0.001mg/kg; Fentanest , Productos Roche, S.A, Madrid, España)
- Tiopental sódico (10 mg/kg, IV, Pentothal Sódico, Abbott laboratorios, S.A., Madrid, España)
- Isoflurano (Forane , Abbott laboratorios, S.A., Madrid, España)
- Buprenorfina (0.01mg/kg/8h, Buprex , Shering-Plough, S.A, Madrid, España)
- Penicilina (Penilevel; 1000000 UI, Laboratorios ERN, Barcelona, España)
- Heparina (Heparina Rovi; 5%, Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A., Madrid; España)

3. Soluciones

- Soluciones de ABZ, ABZSO, ABZSO₂, NTB y OXI en metanol a concentraciones de 0.1, 0.01 y 0.001 µg/mL
- Solución de acetato amónico (0.025M, pH =7.2)

- Solución de dihidrogenofosfato de sodio (0.01 M; pH = 6.9)
- Solución de carboximetilcelulosa en agua (1%)
- Solución de ácido clorhídrico (0.05 M)
- Solución de ácido clorhídrico (3 M)
- Solución de heparina en suero fisiológico (0.05 mg/mL)
- Solución de hidróxido de potasio (1%) con rojo de Alizarina S (6 mg/L)
- Solución de hidróxido de sodio (5N)
- Solución de metanol en agua (10%)

4. Aparatos

4.1. Material de laboratorio en general

- Agitador horizontal (Promax, Heidolph)
- Vórtex (Reax 2000, Heidolph)
- Centrífuga (Omnifugue. ORS, Heraeus)
- Rotavapor (Electr KG, Heidolph)
- Sistema de extracción en fase sólida (Supelco)
- Columnas de extracción en fase sólida (Columnas C18, BondElut, Varian Inc., Harbor City, CA, USA)
- Bomba de Vacío

4.2. Sistema de fermentadores artificiales

Seis fermentadores de flujo doble de 1.32 litros con:

- Agitadores magnéticos
- Gas Nitrógeno
- Saliva artificial con 0.4 g/L de urea
- Ordenador (PC, Personal Computer)
- PLC (Programmable Logic Controller, FieldPoint, Nation Instruments, TX)

4.3. Sistema cromatográfico

El sistema cromatográfico utilizado fue un HPLC (Series HP 1100, Hewlett Packard, GmbH, Waldbronn, Alemania) constituido por:

- Bomba cuaternaria
- Desgasificador
- Inyector automático refrigerado
- Horno para columnas
- Detector espectrofotométrico Diode Array

Como fase estacionaria para separación de los analitos se utilizó una columna de fase reversa C18 (Spherisorb ODS-2 Nucleosil; 5 µm; 20 cm x 4.6 mm; Waters Corporation; Milford, EE.UU.), y para la separación de los enantiómeros se utilizó una columna de α -glicoproteína (Chiral-AGP, 100 x 4.5 µm; ChromTech; Hägersten; Suecia).

5. Animales

5.1. Ovejas

5.1.1. Estudio farmacocinético del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas machos y hembras

Para estudiar el perfil farmacocinético del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas (*Ovis aries*) se utilizaron seis hembras adultas de raza *Manchega*, entre 3 y 4 años de edad, con un peso medio de 65,1 (5.7) kg, y seis machos adultos de raza *Manchega* de entre 3 y 4 años de edad, con un peso medio de 85,9 (9.4) kg. Los animales pertenecían al Servicio de Granjas Experimentales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España). Estos animales tenían libre acceso a alimentación y agua, y se encontraban en un óptimo estado sanitario.

5.1.2. Estudio del paso placentario del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas

Para la realización del estudio del paso placentario de los enantiómeros del ABZSO se utilizaron seis ovejas (*Ovis aries*) adultas de raza Manchega pertenecientes al Servicio de Granjas Experimentales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España). El peso de los animales era de 61.5 (5.7) kg y su edad estaba comprendida entre los 2 y 3 años. Se sincronizó el celo de las ovejas con esponjas intravaginales de progestágenos (CHRONO-GEST). Las esponjas se mantuvieron durante 14 días. Una vez retiradas éstas, las ovejas fueron introducidas en un corral con un macho para su cubrición, entrando en celo a las 24-48 horas posteriores a la retirada de las esponjas. Después de una semana se retiró el macho. A las seis semanas se realizó un control ecográfico a todas las ovejas para confirmación de la gestación.

5.2. Vacas

El fluido ruminal inoculado a los fermentadores fue obtenido de dos vacas lecheras canuladas pertenecientes al Servicio de Granjas Experimentales de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España). Estos animales eran alimentados con una dieta compuesta de heno de alfalfa (60%), trigo (17%), maíz (8.6%), cebada (5%), harina de soja (3.4%), harina de girasol (1.1%), y vitaminas y minerales (2.5%). Esta dieta cumple las recomendaciones nutritivas del NRC (1989) para vacas lecheras.

5.3. Ratas

5.3.1. Estudio del perfil cinético y embriotóxico del ABZSO y de sus enantiómeros en ratas gestantes

Para este estudio se utilizaron 18 ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley. La edad de las ratas estaba comprendida entre las 9-10 semanas y el peso entre 230 y 300 g. Las ratas fueron suministradas por el Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España).

Se determinó el ciclo estral de las ratas por frotis vaginal. Posteriormente, las ratas se introdujeron en jaulas con machos para su cubrición. Se consideró día 0 de gestación el día en que se apreció un residuo de esperma en el frotis vaginal. Las ratas gestantes se alojaron, en grupos de cuatro, en jaulas de policarbonato. La temperatura siempre se mantuvo entre 19-25°C y la humedad relativa a $55 \pm 10\%$. La iluminación también se controlaba para proporcionar un ciclo de 12 h luz-oscuridad. Todos los animales fueron alimentados con una dieta comercial (AO4, PANLAB, Barcelona, España) y disponían de acceso libre a agua.

5.3.2. Estudio farmacocinético del ABZSO y de cada uno de sus enantiómeros en ratas no gestantes

Para este estudio se utilizaron 36 ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley. La edad de las ratas estaba comprendida entre las 9-10 semanas y el peso entre 230 y 300 g. Las ratas fueron suministradas por el Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España). El manejo de los animales fue similar al descrito en el apartado anterior.

6. Diseño experimental

6.1. Estudio farmacocinético del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas machos y hembras

Para este estudio se utilizaron dos grupos de seis ovejas, uno de hembras y el otro de machos. Cada animal fue tratado por vía oral con 7,5 mg/kg de rac-ABZSO (Rycoben SC). Antes de la administración del fármaco se les colocó una cánula en la vena yugular desde donde se tomó una muestra de sangre como control. Después del tratamiento se tomaron muestras de sangre (5 mL) a diferentes tiempos hasta las 70 horas postadministración del fármaco. La cánula para la toma de las muestras se retiraba a las 20 h posteriores a su colocación y las muestras siguientes se obtuvieron por punción de la vena yugular. Todas las muestras se recogieron en tubos de polipropileno heparinizados. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 2000 g durante 20 min para obtener el plasma, que se almacenó a -20°C hasta el análisis.

6.2. Estudio *in vitro* del efecto de la flora ruminal sobre el metabolismo del NTB, ABZ, ABZSO y de los enantiómeros del ABZSO

Para estudiar el efecto de la fermentación ruminal sobre el metabolismo de NTB, ABZ, ABZSO y los enantiómeros del ABZSO se utilizaron seis fermentadores de flujo doble descritos por Hoover y cols. (1976) y modificados por Calsamiglia y cols. (1999) con un volumen de 1.32 L, en dos periodos consecutivos.

Los fermentadores fueron inoculados con fluido ruminal obtenido de las dos vacas lecheras canuladas. El contenido ruminal fue mezclado continuamente (300 rpm) a través de agitadores magnéticos durante todo el estudio. La temperatura de los fermentadores fue mantenida a 38°C, con un pH ajustado a 6.4 por infusión de 3N HCl o 5N NaOH. Las condiciones anaerobias fueron mantenidas por infusión de nitrógeno a un flujo de 40 mL/min. Para simular el reciclaje del nitrógeno fue administrada por infusión continua a los fermentadores saliva artificial (Weller y Pillgrim, 1974) que contenía 0.4 g/L de urea. La tasa de dilución de las fracciones líquida y sólida del contenido de los fermentadores fue mantenida a 10 y 5%/h, respectivamente. Las variables de fermentación fueron monitorizadas y controladas mediante un programa de ordenador (Programmable Logic Controller, FieldPoint, Nation Instruments, TX). A continuación los fermentadores se dejaron acondicionando durante 2 h antes de la administración del fármaco.

Dos horas después de la inoculación de los fermentadores con líquido ruminal, 30 g de la misma dieta que normalmente se utilizaba para la alimentación de las vacas fueron administrados a los fermentadores. En simultáneo, se administraron 104 mg de NTB, 52 mg de ABZ o 39 mg de rac-ABZSO, respectivamente a los distintos fermentadores. Las dosis utilizadas en este estudio fueron equivalentes a las dosis terapéuticas utilizadas ajustadas a la media del volumen ruminal. El estudio se repitió dos días diferentes en seis fermentadores, y cada droga fue administrada a dos fermentadores cada día. Muestras del fluido ruminal (2 mL) fueron tomadas en tiempos predeterminados entre las 0.25 y 8 h postadministración, filtradas y almacenadas a -20°C hasta el análisis.

6.3. Estudio del paso placentario de los enantiómeros del ABZSO en ovejas

6.3.1. Procedimiento quirúrgico

Entre los 120 y 130 días de gestación se procedió a la implantación de catéteres a la madre y al feto siguiendo el procedimiento quirúrgico descrito por Pérez y cols. (1989) con algunas modificaciones adecuadas a las presentes condiciones experimentales.

Después de 12 horas de ayuno, los animales fueron premedicados con Midazolam (0.5 mg/kg), fentanilo (0.001 mg/kg) y tiopental sódico (10 mg/kg) para la sedación e inducción anestésica. La anestesia fue mantenida por intubación con isoflurano y oxígeno (2-3 %, 2 L/min. de Oxígeno) en un circuito semicerrado. Cuando los animales se encontraban anestesiados, y después de la preparación del campo quirúrgico, se procedió a la cirugía. Se accedió al útero a través de una celiotomía caudal. Se exteriorizó el miembro posterior del feto tras una histerotomía y se colocó un catéter de polipropileno en la vena safena fetal. La incisión uterina y abdominal fue cerrada y el catéter fue exteriorizado a través de la región sublumbar de la oveja. Los catéteres fueron llenados con una solución de heparina y cerrados con una llave de tres vías. Para evitar el cierre de los catéteres, éstos fueron lavados dos veces al día. Para evitar posibles infecciones postoperatorias, los animales fueron tratados con una dosis de penicilina G (1,000,000 UI) por vía intramuscular; y para evitar el dolor postquirúrgico, se les

administró buprenorfina (0.01 mg/kg/8h). Finalizada la intervención se dejaron los animales durante tres días con libre acceso a alimentación y agua para su recuperación postoperatoria. Durante el periodo postoperatorio se lavaban los catéteres dos veces al día con una solución heparinizada de suero fisiológico estéril y se comprobaba su funcionamiento.

6.3.2. Estudio cinético

Después de la implantación de los catéteres y del periodo postoperatorio, se les administró por vía oral una dosis de 7.5 mg rac-ABZSO/kg (Rycoben SC). Antes de la administración del fármaco se les colocaba una cánula en la vena yugular y se tomaba una muestra de sangre como control. Después del tratamiento se tomaron muestras de sangre (5 mL) a diferentes tiempos hasta las 70 horas postadministración del fármaco. La cánula para la toma de las muestras se retiraba a las 20 h posteriores a su colocación y las muestras de sangre se tomaron por punción de la vena yugular. Todas las muestras se recogieron en tubos de polipropileno heparinizados. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 2000 g durante 20 min para obtener el plasma, que se almacenó a -20°C hasta el análisis. Paralelamente se tomaron muestras de la sangre de los fetos (0.5 mL) a través del catéter colocado quirúrgicamente. Todas las muestras se recogieron en tubos de polipropileno heparinizados. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 2000 g durante 20 min para obtener el plasma, que se almacenó a -20°C hasta el análisis.

6.4. Estudio del perfil cinético del ABZSO y de sus enantiómeros administrados en forma racémica y por separado a ratas

El estudio cinético del rac-ABZSO, (+)-ABZSO y del (-)-ABZSO se realizó en ratas machos. Los animales fueron divididos en tres grupos de 12 ratas correspondientes a los tres tratamientos realizados. Dentro de los grupos, se ordenaron en sub-grupos de tres ratas de las que se recogieron cuatro muestras de sangre a diferentes tiempos predeterminados durante el experimento. Al primer grupo se les administró una dosis de 10 mg/kg de rac-ABZSO, al segundo grupo 5 mg/kg de (+)-ABZSO y al tercer grupo 5 mg/kg de (-)-ABZSO. La administración se realizó por vía oral a todos los animales. Después de la administración del

fármaco se tomaron muestras de sangre en periodos predeterminados entre las 0.25 y 16 h, con ayuda de un capilar heparinizado en el seno orbital. Todas las muestras se recogieron en tubos de eppendorf heparinizados. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 2000 g durante 20 min para obtener el plasma, que se almacenó a -20°C hasta el análisis. Para evitar el dolor, los animales fueron anestesiados con isoflurano antes de la toma de muestras de sangre. Después del último muestreo los animales fueron eutanasiados.

6.5. Estudio del paso placentario del ABZSO en ratas. Análisis del perfil cinético de la madre gestante

A tres grupos de seis ratas gestantes se les administró en el día 10 de gestación, una dosis única de rac-ABZSO (Rycoben SC) por vía oral. Las dosis administradas fueron de 8.5, 10 y 14 mg/kg. Se escogió el día 10 de gestación y las dosis basándose en estudios previamente realizados tras la administración de netobimin a ratas gestantes en las que se observaron malformaciones congénitas atribuidas a la acción del ABZSO (Cristófol y cols., 1997b; Delatour y cols., 1984; Navarro y cols., 1999).

Después de la administración del fármaco a los animales, se recogieron muestras de sangre en el seno orbital con ayuda de un capilar heparinizado en tiempos predeterminados entre las 0.25 y 8 h postadministración. En cada tiempo se recogieron muestras de tres ratas. A las 9 h postadministración, todos los animales fueron anestesiados con isoflurano y después eutanasiados por exsanguinación. A continuación se recogió su sangre y se procedió a una necropsia para la extracción de los embriones. La sangre recogida fue inmediatamente centrifugada para la separación del plasma. El plasma y los embriones obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta el análisis.

6.6. Análisis de la toxicidad del ABZSO en embriones de rata

Este estudio se realizó en cuatro grupos de ratas gestantes de 10 días. Uno de los grupos fue utilizado como control, a los que se administró el vehículo utilizado para disolver el fármaco. Los otros tres grupos fueron tratados por vía oral con una dosis única de 8.5, 10, o 14 mg/kg de

rac-ABZSO (Rycoben SC).

En el día 20 de gestación y previa anestesia profunda con isoflurano, se practicó una ovariectomía a todas las madres, extrayendo individualmente del útero cada feto con su placenta. Los fetos fueron sacrificados con una sobredosis de isoflurano. Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de isoflurano. De los úteros extraídos de los animales se controlaron los siguientes parámetros:

- Número de cuerpos lúteos
- Número y distribución de los puntos de implantación. Las implantaciones se clasificaron como reabsorciones, fetos muertos y fetos vivos
- Peso individual de los fetos
- Malformaciones externas de los fetos
- Anomalías de los principales órganos maternos

A partir de los datos obtenidos se calcularon los siguientes parámetros:

- Pérdidas pre-implantación (%) = $(N1 - N2 / N1) \times 100$
- Pérdidas post-implantación (%) = $(N2 - N3 / N2) \times 100$
- Porcentaje de reabsorciones (%) = $(N4 / N2) \times 100$
- Porcentaje de fetos vivos (%) = $(N3 / N2) \times 100$

Siendo: N1 = Número de cuerpos lúteos; N2 = Número de puntos de implantación; N3 = Número de fetos vivos; N4 = Número de reabsorciones.

7. Métodos analíticos empleados

7.1. Extracción de los analitos de las muestras de plasma o embrión

El ABZSO, ABZSO₂, y ABZ fueron extraídos de las muestras de plasma de ratas, ovejas y de

los embriones siguiendo el protocolo que se detalla a continuación.

Se colocaron en un tubo de vidrio con tampón de rosca 1 mL de plasma o 1 g de los embriones. Se añadieron 2,5 µg de OXI como patrón interno, 1 mL de solución acetato amónico (0.025M, pH 7.2) y 10 mL de acetato de etilo. En el caso de los embriones, éstos fueron previamente homogeneizados mediante un ultratúrax. El contenido obtenido se agitó al vórtex durante 30 s y a continuación durante 20 min en un agitador horizontal; después se centrifugaron a 2000 g durante 20 min. Se recogía la fase orgánica, se transfería a tubos cónicos y se secaba al rotavapor en un baño a 37°C. El extracto seco obtenido se redisolvió con 300µL de la fase móvil y se inyectaban 50 µL de estas muestras redisueltas en el cromatógrafo para su separación y cuantificación.

7.2. Extracción de los analitos del contenido ruminal

7.2.1. Preparación de las muestras

0.5 mL de las muestras de fluido ruminal se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se les añadieron 2.5 µg de OXI como patrón interno y 0.5 mL de acetonitrilo, y se agitaron al vórtex durante 10 segundos. Tras la agitación se centrifugaron a 17000 g. Se recogió la fase orgánica y se transfirió a un tubo de vidrio donde se le añadieron 5 mL de agua bidestilada. El contenido se agitó durante 5 segundos al vórtex. A continuación se procedió a la extracción de las muestras utilizando columnas de fase sólida (C18). Estas columnas eran acondicionadas previamente en el extractor de vacío con 0.5 mL de metanol y 0.5 mL de agua bidestilada, consecutivamente.

7.2.2. Extracción en fase sólida

Después de acondicionar la columna, y sin dejarla secar, se pasaban las muestras previamente preparadas por la columna. Tras pasar la muestra, y sin dejar secar la columna, se pasaban 0.5 mL de 90% H₂O bidestilada + 10% MeOH para lavar la muestra. Posteriormente se dejaba secar la muestra durante 5 min.

Una vez seco el cartucho de extracción se le pasaban 3 mL de metanol para eluir la muestra recogiendo el contenido en un tubo de ensayo de 5 mL. Se secaba el metanol con un flujo de nitrógeno colocando los tubos en un baño a 40 °C. El extracto seco obtenido se redisolvió con 300 µL de la fase móvil utilizada para la separación cromatográfica y se inyectaron 50 µL de estas muestras en el cromatógrafo para su separación y cuantificación.

7.3. Cuantificación cromatográfica de los analitos en las muestras

La técnica de extracción y determinación de los diferentes analitos en el plasma, los embriones y en el fluido ruminal, fue validada antes de analizar las diferentes muestras de acuerdo con las recomendaciones de la EMEA (1998).

7.3.1. Determinación del NTB, ABZ, ABZSO y ABZSO₂ en fluido ruminal, plasma y embriones

Para la determinación de las concentraciones del ABZSO-total, NTB, ABZSO₂ y ABZ en las muestras analizadas (fluido ruminal, plasma y embriones) se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ y una fase móvil compuesta de una solución de acetato amónico (0,025 M, pH 7,2) y acetonitrilo aplicándose un gradiente lineal en una proporción inicial de 27:73 hasta llegar a 65:35 en 5 min, seguido de un acondicionamiento de la columna durante 3.5 min a proporciones iniciales, con un flujo de 1,5 mL/min. La detección ultravioleta se realizó a 292 nm. Bajo estas condiciones, los tiempos de retención observados fueron: 2.9, 3.3, 3.8, 5.4, y 6.4 min. para el ABZSO, NTB, ABZSO₂, OXI y ABZ, respectivamente. Los límites de cuantificación fueron de 0.02 µg/mL para ABZSO₂ y de 0.01 µg/mL para los restantes analitos.

7.3.2. Separación y cuantificación de los dos enantiómeros del ABZSO

Durante la separación cromatográfica de los analitos con el método descrito en el apartado anterior, se recogía la fase móvil correspondiente al pico de ABZSO (2.9 min). Se secaba la fase móvil bajo corriente de nitrógeno y el residuo era redisoluelto con 200 µL de una solución de NaH₂PO₄ (0.01 M; pH = 6.9), de los cuales 50 µL eran inyectados en el cromatógrafo. La

separación cromatográfica de los enantiómeros de ABZSO se realizaba con una columna quiral de α -glicoproteína, con una fase móvil compuesta por una solución de NaH_2PO_4 (0.01 M; pH = 6.9) y 2-Propanol (99:1). El flujo de trabajo fue de 0.9 mL/min y la detección espectrofotométrica se realizó a 292 nm. En estas condiciones, los tiempos de retención para los dos enantiómeros del ABZSO fueron de 3.3 min para (-)-ABZSO y de 5.3 min para el (+)-ABZSO. El límite de cuantificación de esta técnica se estableció en 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

Después de la separación cromatográfica de los enantiómeros se determinó el área de cada pico y se calculó el porcentaje de cada uno en función del área total de los dos enantiómeros. Se calcularon las concentraciones de los enantiómeros a partir del porcentaje de cada enantiómero respecto a la concentración del ABZSO-total, observada según la metodología descrita en el apartado anterior.

7.4. Estudio de las malformaciones esqueléticas

Para el estudio de las malformaciones esqueléticas de los fetos de rata se utilizó una tinción del esqueleto con rojo de alizarina S y posteriormente se transparentaron los tejidos blandos según lo descrito por Staples y Schenell (1964). Esto se realizó del modo siguiente:

- Se evisceraban los fetos
- Se fijaban manteniéndolos en una solución de alcohol etílico de 70° un mínimo de 10 días
- Se maceraban los tejidos blandos de los fetos mediante una solución de KOH (1%) durante 24 h
- Tras un lavado con agua corriente, los fetos se teñían introduciéndolos durante 2 días en una solución de KOH (1%) con Alizarina S (6 mg/mL)
- Los fetos se transparentaron, con un lavado de agua corriente y con su introducción en una solución de glicerol/alcohol etílico al 70°/alcohol benzílico, en proporción 2:2:1, durante varios días hasta que la transparentación fue total
- La conservación de los fetos se realizó en una solución de glicerol y alcohol etílico 70° (1:1). Se añadieron unos cristales de timol para prevenir la aparición de hongos

La nomenclatura utilizada para la descripción anatómica de las malformaciones esta de acuerdo con Nomina Anatómica Veterinaria y Nomina Embryologica Veterinaria (1994).

8. Análisis farmacocinético

Las curvas de los niveles plasmáticos respecto al tiempo para cada analito, fueron analizadas de modo individual para cada oveja y cada feto. En las ratas solo se disponía de una única curva proveniente de los valores medios de tres animales en cada momento de muestreo. Estos parámetros se obtuvieron a partir de un análisis no compartimental basado en la teoría de momentos estadísticos (Berrozpe y cols., 1997). De acuerdo con este modelo de análisis, el área bajo la curva de las concentraciones (AUC) es el momento estadístico de orden cero, y el tiempo medio de residencia (MRT) es el momento de orden uno correspondiente a la curva concentración-tiempo. En el fluido ruminal solamente se calculó el AUC. Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron los siguientes:

- **Área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas respecto al tiempo (AUC_{0-t}):** Este parámetro se determinó mediante el método de los trapezoides basándose en la formula siguiente:

$$AUC_{(0-n)} = \sum_0^n \frac{C_{(n-1)} + C_n}{2} (t_n - t_{n-1})$$

- **Tiempo medio de residencia (MRT):** Tiempo que, en promedio, permanece de forma inalterada una molécula de fármaco en el organismo, durante su tránsito por él. Este parámetro se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{MRT}_{(0-t)} = \frac{\text{AUMC}_0^t}{\text{AUC}_0^t}$$

De donde AUMC es la área bajo la curva del producto Concentración-tiempo, respecto al tiempo postadministración, que se calcula con la fórmula siguiente:

$$\text{AUMC}_{(0-n)} = \sum_0^n \frac{C_{(n-1)}t_{(n-1)} + C_n t_n}{2} (t_n - t_{n-1})$$

La concentración plasmática máxima (Cmax) y el tiempo en el cual se observa (Tmax) corresponden a los valores observados para cada animal. Son parámetros que nos dan la idea de los procesos de absorción y de formación de los fármacos y de sus metabolitos.

Para el cálculo de estos parámetros farmacocinéticos se utilizó el programa informático PKSolutions (Farrier, 1997).

9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los valores obtenidos en los diferentes estudios se utilizó el programa informático de análisis estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS 8.0.1, SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) y se aceptaron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Este análisis se efectuó del modo siguiente:

9.1. Estudio farmacocinético del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas machos y hembras

En el estudio del comportamiento cinético en ovejas machos y hembras se compararon los parámetros cinéticos obtenidos para cada sustancia entre machos y hembras. Los parámetros farmacocinéticos de los enantiómeros también se compararon dentro del mismo sexo. Dicha comparación se efectuó mediante el test ANOVA previa logotransformación de los valores correspondientes a cada parámetro excepto para el Tmax. Para la comparación del Tmax se utilizó el test no paramétrico de U-Mann-Withney.

9.2. Estudio del metabolismo ruminal de NTB, ABZ, ABZSO y de sus enantiómeros

En el estudio del metabolismo ruminal de NTB, ABZ, ABZSO se procedió a la comparación estadística de las AUCs entre los enantiómeros de ABZSO en cada tratamiento previa logotransformación de los datos. Esta comparación se realizó a través del test de análisis de varianza (ANOVA).

9.3. Estudio del paso placentario del ABZSO y de sus enantiómeros en ovejas

En el estudio del paso placentario se procedió a la comparación de los parámetros farmacocinéticos de las sustancias analizadas entre las madres y los fetos. También se compararon los parámetros farmacocinéticos de los enantiómeros entre sí dentro de las madres y de los fetos. Los tests utilizados fueron los mismos que los del apartado anterior.

9.4. Estudio de las concentraciones embrionarias de ABZSO en ratas

En el estudio de las concentraciones embrionarias se procedió a la comparación de las

concentraciones de los enantiómeros obtenidas en el plasma de las madres y en los embriones en el momento del sacrificio, y a la comparación de las concentraciones de los diferentes analitos entre los embriones y las madres dentro del mismo tratamiento. A continuación se procedió a la comparación de los valores entre los diferentes grupos de tratamiento, Estas comparaciones se efectuaron mediante el test estadístico ANOVA.

9.5. Estudio de la toxicidad del ABZSO en embriones de ratas

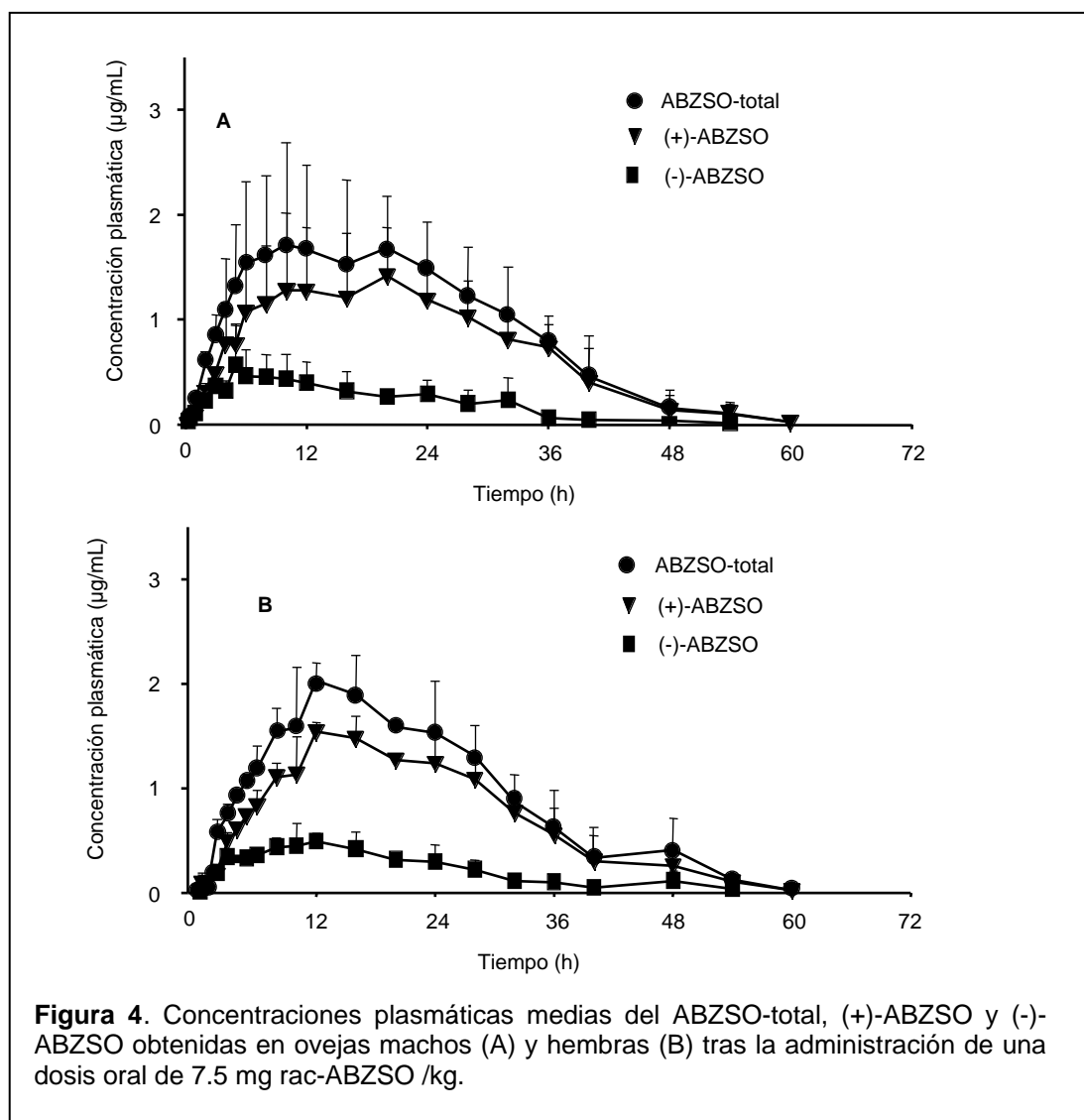
Para analizar los datos de la embriotoxicidad y teratogenicidad, los fetos fueron agrupados en camadas respecto al tratamiento, considerándose cada madre como una camada y tomándose los valores medios obtenidos en cada grupo de tratamiento.

Las variables analizadas se muestran en la tabla 11 del apartado de los resultados. Las diferencias en el peso fetal, como es una variable continua, fue analizada por ANOVA. Las diferencias entre las medias del número de cuerpos lúteos y del número total de puntos de implantación entre los diferentes grupos de ratas tratadas, se analizaron mediante el test estadístico no paramétrico de U-Mann-Withney. Para estudiar estadísticamente los efectos embriocetales y teratógenos comparando el grupo control y cada uno de los grupos tratados se utilizó el test estadístico Dunn's.

Resultados

1. Análisis de la cinética plasmática de los enantiómeros del ABZSO en ovejas machos y hembras

En la Figura 4 se han representado las concentraciones plasmáticas del ABZSO-total y sus enantiómeros observados en ovejas machos (A) y hembras (B) después de la administración de una dosis oral de 7.5 mg rac-ABZSO/kg. En éstas se puede observar que el (+)-ABZSO es



el enantiómero que se encuentra en el plasma en mayores proporciones, tanto en los machos como en las hembras, alcanzándose unas C_{max} de 1.5 $\mu\text{g/mL}$ entorno a las 13 y 18 h, respectivamente.

Las C_{max} observadas para el (-)-ABZSO fueron similares entre machos (0.47 $\mu\text{g/mL}$) y hembras, (0.48 $\mu\text{g/mL}$), y se detectaron a las 7,3 y 17,0 h respectivamente. En la Tabla 1 se muestran los parámetros farmacocinéticos obtenidos para cada uno de los enantiómeros del ABZSO tras el tratamiento de ovejas machos y hembras con una dosis de 7.5 mg/kg de rac-ABZSO.

En ambos sexos, los valores obtenidos para AUCs, C_{max} y MRT del (+)-ABZSO fueron significativamente superiores a los del (-)-ABZSO. El T_{max} del (+)-ABZSO fue superior que del (-)-ABZSO solamente en ovejas machos. No se observaron diferencias significativas entre sexos para los parámetros analizados, excepto para el T_{max} del (-)-ABZSO que fue superior para las hembras.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos correspondientes al (+)-ABZSO y (-)-ABZSO, obtenidos tras la administración oral de 7.5 mg/kg de rac-ABZSO a ovejas machos y hembras.

	Machos		Hembras	
	(+)-ABZSO	(-)-ABZSO	(+)-ABZSO	(-)-ABZSO
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	1.63 \pm 0.30	0.47 \pm 0.19 ^b	1.45 \pm 0.22	0.48 \pm 0.15 ^b
T_{max} (h)	13.67 \pm 4.27	7.33 \pm 2.66 ^{ab}	18.00 \pm 6.57	17.00 \pm 7.35 ^a
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	51.68 \pm 13.56	8.92 \pm 3.36 ^b	40.12 \pm 5.49	10.08 \pm 3.24 ^b
MRT (h)	23.37 \pm 0.87	16.08 \pm 1.20 ^b	21.22 \pm 2.96	17.38 \pm 2.49 ^b

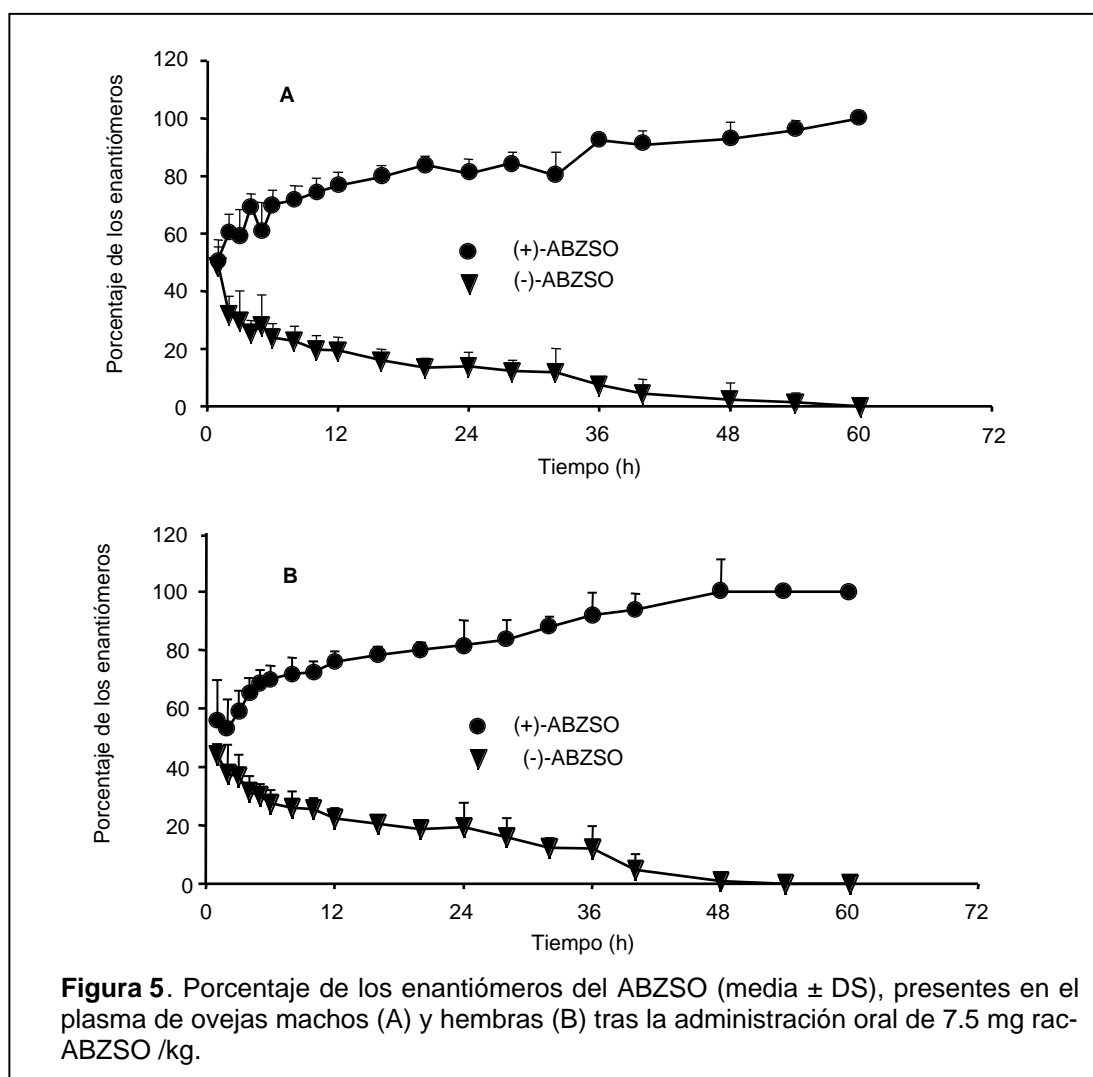
Valores dados como media \pm DS (n=6)

a. Diferencias significativas entre sexos a $p < 0.05$

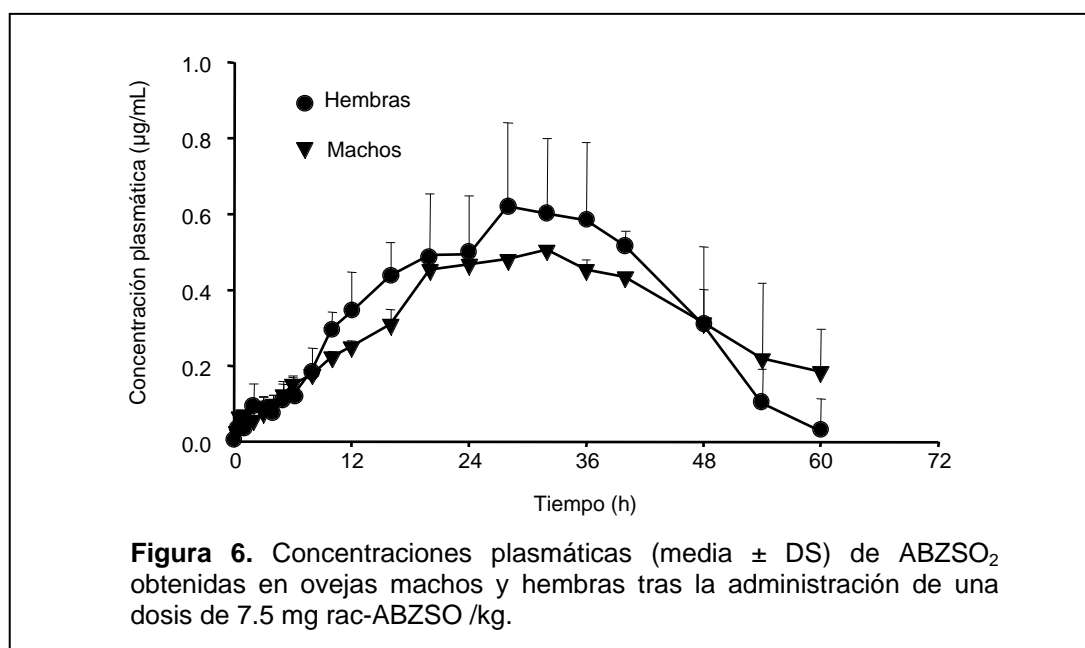
b. Diferencias entre los enantiómeros dentro del mismo sexo a $p < 0.05$

La Figura 5 muestra la evolución porcentual de los niveles plasmáticos de los enantiómeros del

ABZSO para machos (A) y hembras (B). En ellas se puede observar que, en ambos sexos, las proporciones iniciales de los enantiómeros son similares a los presentes en la forma racémica; con el tiempo el porcentaje de (+)-ABZSO aumenta considerablemente, respecto al de (-)-ABZSO, llegando a alcanzar proporciones alrededor del 90%, confirmando que el enantiómero negativo se elimina con más celeridad que el positivo. Como se puede observar existe poca variabilidad.



En la Figura 6 se representan las curvas de niveles plasmáticos del ABZSO₂ obtenidas tras el tratamiento con rac-ABZSO en ovejas machos y hembras. En ella se puede observar que los perfiles de las curvas son similares para ambos sexos, apareciendo concentraciones máximas (C_{max}) alrededor de las 30 horas. Las concentraciones de ABZSO₂ fueron siempre muy inferiores a las observadas a los mismos tiempos del ABZSO.



En la Tabla 2 se encuentran los parámetros farmacocinéticos del ABZSO-total y de su metabolito el ABZSO₂. No se observaron diferencias significativas entre sexos en ninguno de los parámetros calculados para ambas sustancias. No obstante se puede observar que la AUC del ABZSO fue significativamente superior a la del ABZSO₂, con un mayor MRT para la sulfona tanto en machos como en hembras.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos correspondientes al ABZSO-total y ABZSO₂, obtenidos tras la administración oral de 7.5 mg/kg de rac-ABZSO a ovejas machos y hembras.

	ABZSO-total		ABZSO ₂	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<i>C</i> _{max} (µg/mL)	2.05 ± 0.41	1.83 ± 0.35	0.52 ± 0.12	0.83 ± 0.44
<i>T</i> _{max} (h)	12.33 ± 4.63	14.33 ± 3.67	33.33 ± 4.13	32.67 ± 6.89
<i>AUC</i> _{0-t} (µg·h/mL)	60.85 ± 14.62	49.68 ± 8.50	21.75 ± 5.34	24.30 ± 6.64
<i>MRT</i> (h)	21.45 ± 0.98	20.32 ± 2.59	36.80 ± 4.61	35.10 ± 6.25

Valores dados como media ± DS (n=6)

2. Estudio del efecto de la flora ruminal en la biotransformación del NTB, ABZ, ABZSO y de sus enantiómeros en rúmenes artificiales

En la Figura 7 se encuentran representadas las concentraciones de NTB, ABZ, ABZSO y ABZSO₂ observadas en el fluido ruminal tras la incubación del NTB (A), ABZ (B) y ABZSO (C) en el sistema de fermentadores artificiales. Tras la incubación del NTB (Figura 7A) se pudo observar la nitroreducción del NTB a ABZ. A las 2 h de incubación, las concentraciones molares de ABZ se igualaron con las de NTB. La sulfoxidación, generando ABZSO, fue bastante limitada y las concentraciones molares de ABZSO obtenidas fueron tres veces inferiores a las de ABZ. Cuando el fármaco incubado fue el ABZ (Figura 7B) se observó una actividad oxidativa reducida proporcionando concentraciones de ABZSO aproximadamente a una tercera parte de las de ABZ. Tras la incubación del ABZSO (Figura 7C) se observó una elevada actividad reductora, generándose ABZ, equilibrándose ambas concentraciones a las 2 h posteriores al inicio de la incubación. Esta fue la única incubación donde se observaron concentraciones significativas de ABZSO₂.

La Figura 8 muestra la evolución con el tiempo de los porcentajes de cada uno de los

enantiómeros del ABZSO presentes en cada incubación. La proporción de los enantiómeros respecto al ABZSO-total se sitúa entorno al 50%, excepto en el caso en el que se incubó el rac-ABZSO, donde durante las primeras 4 h, el porcentaje del (+)-ABZSO fue ligeramente superior al del (-)-ABZSO.

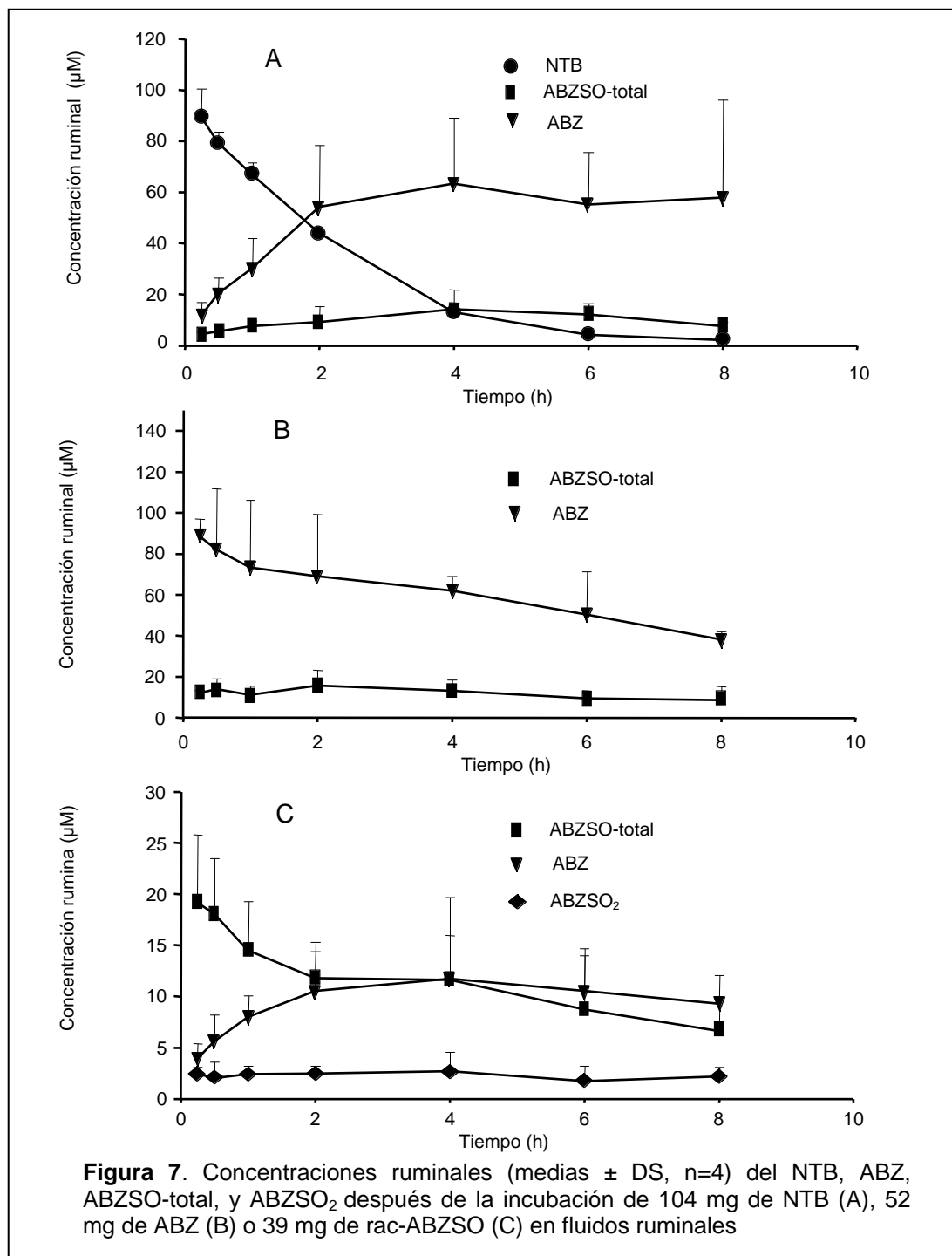
La Tabla 3 muestra las AUCs calculadas a partir del análisis del perfil de las concentraciones ruminales respecto al tiempo para cada analito así como de los enantiómeros del ABZSO. Estas AUC reflejan la cantidad total de cada compuesto presente en cada fermentador durante el tiempo en que se realizó la incubación. Los resultados obtenidos para las AUCs (Tabla 3) demuestran que éstas fueron muy elevadas para el NTB y para el ABZ en todos los tratamientos, mientras que para el ABZSO en todos los casos se obtuvieron valores bajos.

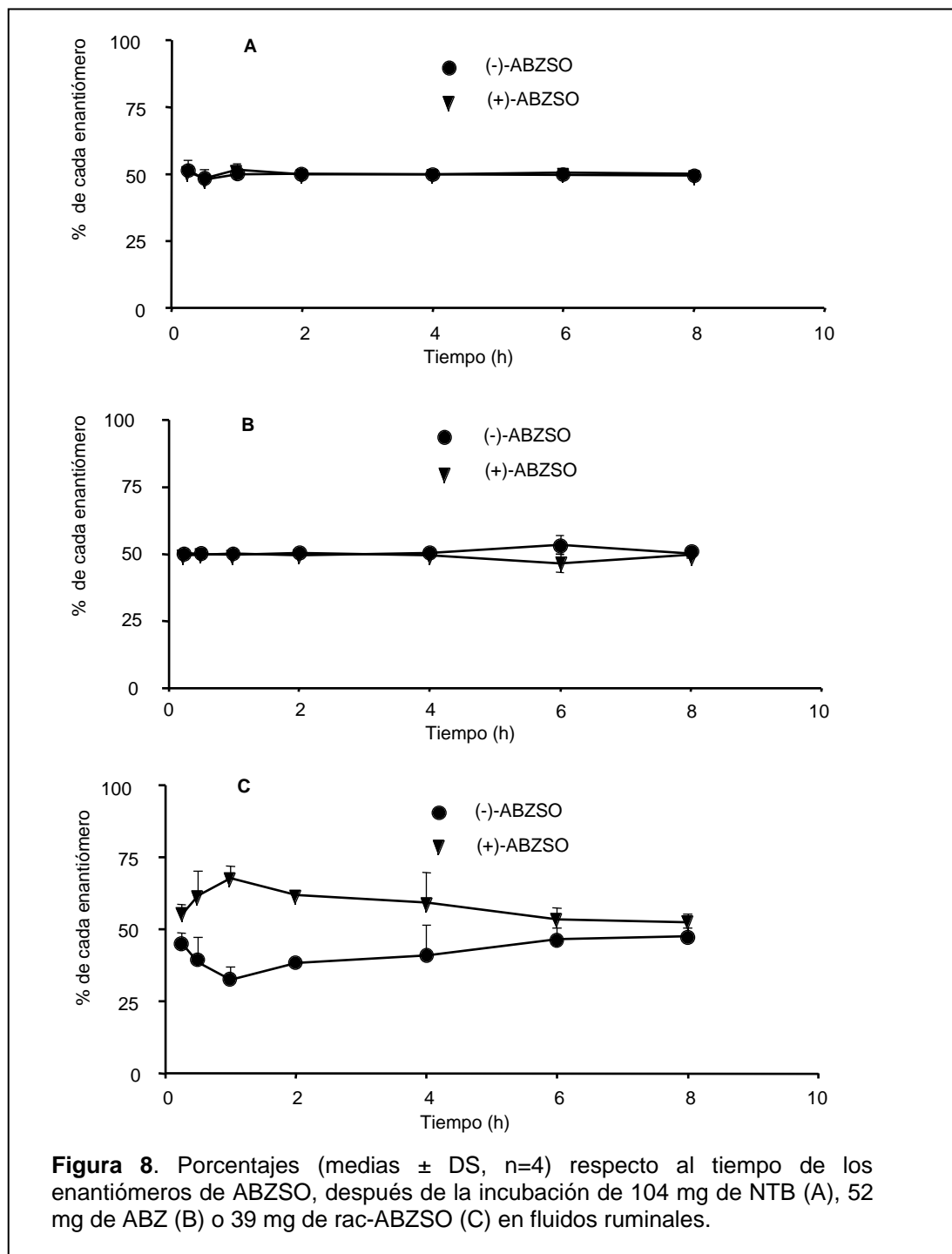
Las AUCs obtenidas para los enantiómeros del ABZSO en todas las incubaciones no mostraron diferencias significativas entre ellos, en cuanto a su formación (Figuras 8A y 8B) o desaparición (Figura 8C). No obstante, tras la incubación del ABZSO se pudo observar que existen pequeñas diferencias no significativas en los valores de AUC, y que estas se corresponden con las diferencias observadas en porcentajes de cada uno de ellos durante las 4-6 primeras horas del muestreo (Figura 8C).

Tabla 3. Áreas bajo curva ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) de las concentraciones de NTB, ABZ, ABZSO, sus enantiómeros y de ABZSO₂, obtenidas tras la incubación de NTB, ABZ o rac-ABZSO en fluidos ruminales utilizando un sistema de rúmenes artificiales

	NTB	ABZ	rac-ABZSO
<i>NTB</i>	188.6 ± 26.7	NA	NA
<i>ABZ</i>	409.4 ± 165.4	473.3 ± 144.9	78.4 ± 22.9
<i>ABZSO</i>	82.6 ± 25.0	92.8 ± 41.9	85.0 ± 34.0
<i>ABZSO₂</i>	NA	NA	17.8 ± 7.0
<i>(-)-ABZSO</i>	41.4 ± 12.4	47.3 ± 22.0	35.1 ± 16.3
<i>(+)-ABZSO</i>	41.2 ± 12.6	45.5 ± 19.9	49.9 ± 18.3

Valores dados como media ± DS (n=4); NA = No aplicable





3. Estudio del paso placentario de los enantiómeros del ABZSO en ovejas

En la Figura 9 se pueden observar las concentraciones plasmáticas del ABZSO-total, (+)-ABZSO y (-)-ABZSO, en madres (A) y fetos (B) tras la administración por vía oral de una dosis de 7.5 mg/kg de rac-ABZSO a ovejas gestantes. Las concentraciones de ambos enantiómeros fueron similares en los primeros momentos postadministración, siendo las del (+)-ABZSO superiores a las del (-)-ABZSO, tanto en las madres como en los fetos. También se puede

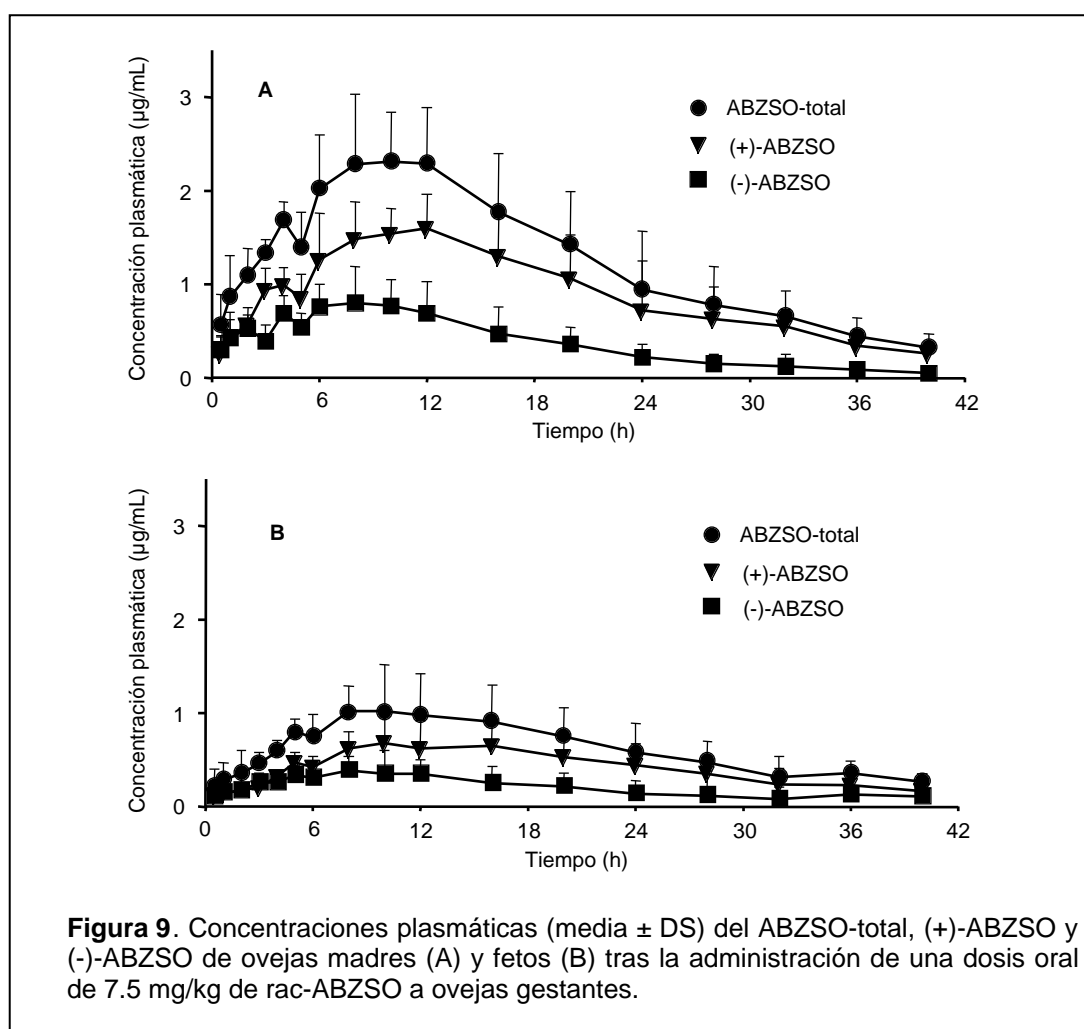
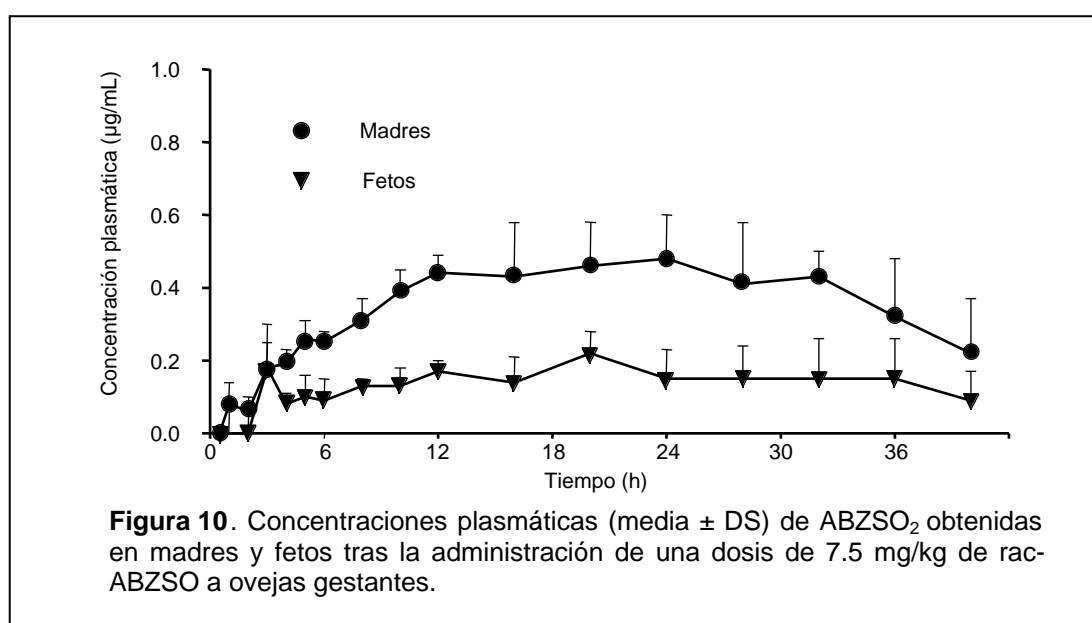


Figura 9. Concentraciones plasmáticas (media \pm DS) del ABZSO-total, (+)-ABZSO y (-)-ABZSO de ovejas madres (A) y fetos (B) tras la administración de una dosis oral de 7.5 mg/kg de rac-ABZSO a ovejas gestantes.

observar que las concentraciones del ABZSO-total y de los respectivos enantiómeros fueron aproximadamente el doble en las madres que en los fetos.

La evolución de las concentraciones plasmáticas respecto al tiempo obtenidas para el ABZSO₂ en madres y en fetos está representada en la Figura 10. En ésta se observa que las concentraciones fueron superiores en las madres que en los fetos, y al igual de lo sucedido para el ABZSO, las concentraciones fetales de este metabolito fueron aproximadamente mitad de las de la madre.



Los parámetros cinéticos del ABZSO-total y del ABZSO₂ se muestran en la Tabla 4. Las C_{max} y el AUC del ABZSO-total y del ABZSO₂ obtenidas en los fetos fueron aproximadamente la mitad de los valores observados en las madres, presentando diferencias estadísticamente significativas. En cambio los parámetros referentes al tiempo (T_{max} y MRT) no presentaron diferencias significativas entre las madres y los fetos.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos correspondientes al ABZSO-total y ABZSO₂ de madres y fetos obtenidos tras la administración oral de 7.5 mg/kg de rac-ABZSO a ovejas gestantes.

	ABZSO-total		ABZSO ₂	
	Madres	Fetos	Madres	Fetos
<i>C</i> _{max} (µg/mL)	2.5 ± 0.6 ^a	1.2 ± 0.4	0.6 ± 0.2 ^a	0.3 ± 0.1
<i>T</i> _{max} (h)	11.0 ± 4.9	9.3 ± 3.0	20.7 ± 6.4	19.6 ± 10.8
<i>AUC</i> _{0-t} (µg·h/mL)	60.0 ± 16.5 ^a	27.4±9.2	16.1±3.4 ^a	5.4 ± 2.6
<i>MRT</i> (h)	16.5 ± 1.8	17.7 ± 2.0	43.4 ± 20.2	31.3 ± 2.8

Valores dados como media ± DS (n=5)

a. Diferencias significativas entre madres y fetos.

En la Tabla 5 se muestran los parámetros cinéticos del (+)-ABZSO y (-)-ABZSO en la madre y en el feto. Al comparar los valores de los parámetros cinéticos de ambos enantiómeros en las madres, se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros analizados, excepto para *T*_{max}, tal y como se observó en el apartado anterior en ovejas no gestantes. En cambio, esta comparación, en los fetos, no presentó diferencias significativas en ninguno de los parámetros, indicando que los dos enantiómeros del ABZSO presentan un perfil cinético similar, a diferencia de lo observado en las madres. Cuando se compararon los parámetros obtenidos para los enantiómeros en las madres y los fetos se pudo observar que existían diferencias significativas en la *C*_{max} y la *AUC*, presentando las madres unos valores de estos parámetros superiores a los de los fetos. Por otra parte, tampoco se observaron diferencias entre las madres y los fetos en la *T*_{max} y el *MRT* tal y como se observó para el ABZSO-total y la sulfona.

Comparando las *AUC* de las diferentes moléculas entre el feto y la madre se puede valorar la exposición del feto a las distintas sustancias. Así la relación de *AUC* madre/feto fue de 2.3, 2.5, 1.42 y 3.0 para el ABZSO-total, (+)-ABZSO, (-)-ABZSO y ABZSO₂, respectivamente. Por otra parte, la relación de *AUC* entre un fármaco y su metabolito dentro de las madres o los fetos nos da la idea de la posible existencia de metabolismo en el feto. Así pues, la relación de *AUC* entre ABZSO₂ y ABZSO-total en las madres y los fetos fueron de 0.27 y 0.22,

respectivamente.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos correspondientes al (+)-ABZSO y (-)-ABZSO en las madres y los respectivos fetos, obtenidos tras la administración oral de 7.5 mg/kg de rac-ABZSO a ovejas gestantes.

	Madres		Fetos	
	(+)-ABZSO	(-)-ABZSO	(+)-ABZSO	(-)-ABZSO
<i>C_{max}</i> (µg/mL)	1.9 ± 0.4 ^{ab}	1.0 ± 0.3 ^a	0.8 ± 0.3	0.5 ± 0.2
<i>T_{max}</i> (h)	12 ± 4.2	7.6 ± 2.9	9.8 ± 3.3	8.0 ± 4.0
<i>AUC_{0-t}</i> (µg·h/mL)	42.4 ± 10.5 ^{ab}	15.3 ± 5.1 ^a	16.8 ± 4.0	10.8 ± 5.4
<i>MRT</i> (h)	17.0 ± 1.6 ^b	13.1 ± 1.8	17.2 ± 1.0	15.9 ± 3.3

Valores dados como media ± DS (n=5)

a. Diferencias significativas entre madres y fetos

b. Diferencias significativas entre los enantiómeros del mismo grupo de estudio.

4. Estudio de la disposición a nivel embrionario del ABZSO y sus enantiómeros en ratas

En la Figura 11 están representadas las concentraciones plasmáticas respecto al tiempo del ABZSO-total, (+)-ABZSO, (-)-ABZSO y ABZSO₂ observadas tras de la administración oral de diferentes dosis (8.5, 10 y 14 mg/kg) de rac-ABZSO a ratas gestantes. En todos casos, el (-)-ABZSO presentó concentraciones plasmáticas ligeramente superiores a las de (+)-ABZSO.

En la Tabla 6 se muestran los parámetros cinéticos calculados para el ABZSO-total y para el ABZSO₂ obtenidos tras el tratamiento con cada una de las tres dosis citadas anteriormente. Se puede observar que las AUCs y C_{max} del ABZSO aumentan al incrementar la dosis aunque este aumento no presenta proporcionalidad con el incremento de dosis. Las C_{max} del ABZSO₂ se obtuvieron unas 4 h después de las del ABZSO-total.

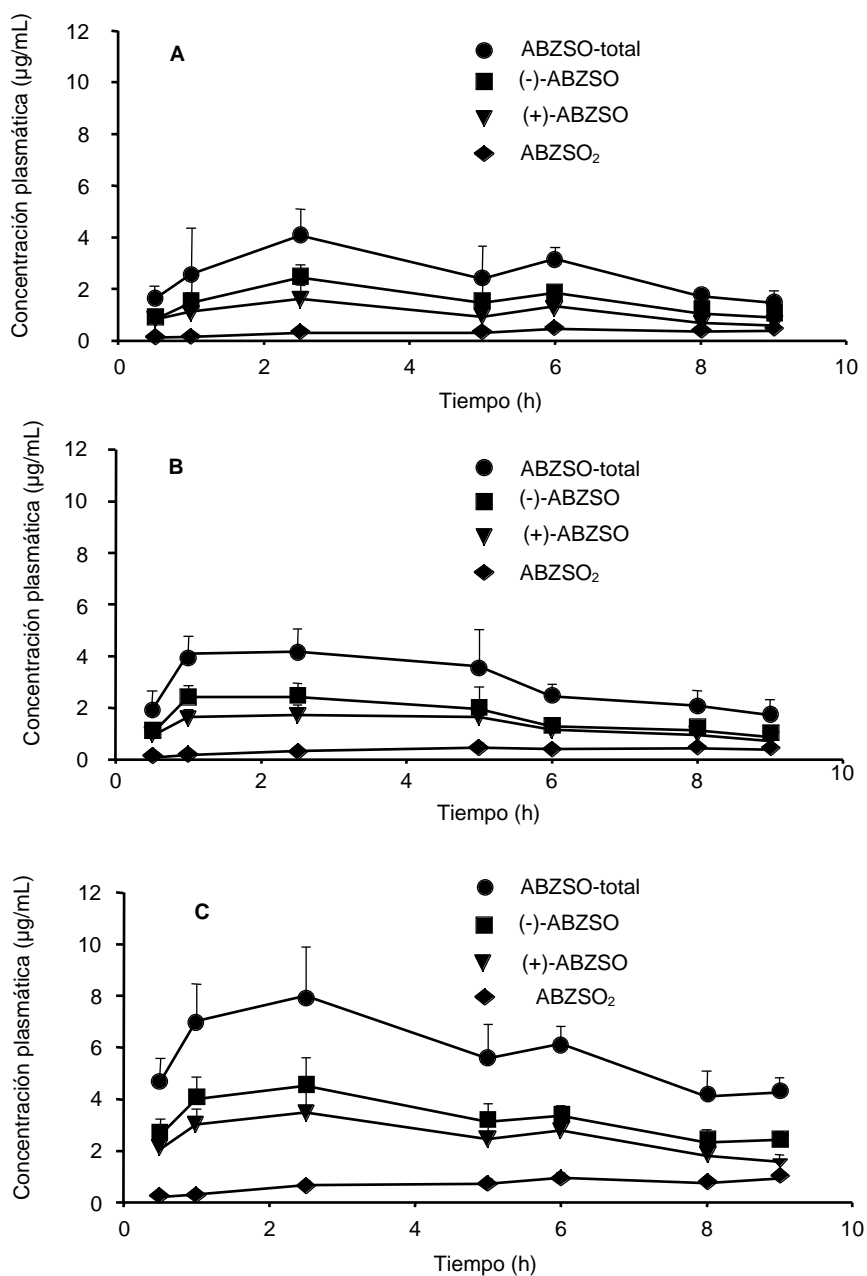


Figura 11. Concentraciones plasmáticas (media ± DS) del ABZSO-total, (+)-ABZSO, (-)-ABZSO y ABZSO₂ obtenidas en ratas tras la administración de 8.5 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 14 mg/kg (C) de rac-ABZSO a ratas gestantes.

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos correspondientes al ABZSO-total y ABZSO₂ observados en ratas gestantes tratadas con 8.5, 10 o 14 mg/kg de rac-ABZSO

<i>Dosis (mg/kg)</i>	ABZSO-total			ABZSO₂		
	8.5	10	14	8.5	10	14
<i>C_{max} (µg/mL)</i>	4.1 ± 1.0	4.2 ± 0.9	8.0 ± 1.9	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.2
<i>T_{max} (h)</i>	2.5	2.5	2.5	6.0	5.0	6.0
<i>AUC_{0-t} (µg·h/mL)</i>	23.7	27.2	52.8	2.6	3.1	6.0

Valores dados como media ± DS (n=6)

En la Tabla 7 se muestran los parámetros cinéticos de los enantiómeros del ABZSO obtenidos en los tres tratamientos. En todos ellos, las C_{max} y las AUCs observadas para el (-)-ABZSO fueron superiores a las obtenidas para el (+)-ABZSO. Las T_{max} fueron iguales en todos los tratamientos, para los dos enantiómeros.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos correspondientes al (+)-ABZSO y (-)-ABZSO observados en ratas gestantes tratadas con 8.5, 10 o 14 mg/kg de rac-ABZSO

<i>Dosis (mg/kg)</i>	(+)-ABZSO			(-)-ABZSO		
	8.5	10	14	8.5	10	14
<i>C_{max} (µg/mL)</i>	1.6 ± 0.5	1.7 ± 0.4	3.5 ± 0.8	2.5 ± 0.5	2.4 ± 0.5	4.5 ± 1.1
<i>T_{max} (h)</i>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>AUC₀₋₉ (µg·h/mL)</i>	9.6	12.0	23.1	14.1	15.3	29.6

Valores dados como media ± DS (n=6)

En la Tabla 8 se encuentran los valores correspondientes a las concentraciones plasmáticas maternas y embrionarias del ABZSO-total, de sus enantiómeros y del ABZSO₂ en el momento del sacrificio (9 h post-tratamiento). Las concentraciones plasmáticas de todos los analitos encontradas tras la dosis de 8.5 mg/kg fueron semejantes a las obtenidas cuando se administraron 10 mg/kg. En cambio, al comparar estas dosis con la de 14 mg/kg, se

encontraron diferencias estadísticamente significativas para todas las moléculas. Al igual que en el plasma materno, las concentraciones embrionarias de los analitos fueron semejantes entre la dosis de 8.5 y la de 10 mg/kg, difiriendo éstas con la dosis de 14 mg/kg.

Tabla 8. Valores medios de las concentraciones plasmáticas y embrionarias ($\mu\text{g/mL}$ o $\mu\text{g/g}$) del ABZSO-total, (-)-ABZSO, (+)-ABZSO y ABZSO₂ obtenidos 9 horas después de la administración oral a ratas gestantes de 8.5, 10, o 14 mg/kg de rac-ABZSO

Dosis (mg/kg)		8.5	10	14
ABZSO-total	Madre	1.5 \pm 0.5	1.6 \pm 0.6 ^c	4.3 \pm 0.6 ^{bd}
	Embrión	1.3 \pm 0.7	1.8 \pm 1.0	2.2 \pm 1.0 ^d
(-)-ABZSO	Madre	0.9 \pm 0.3 ^a	0.9 \pm 0.4 ^c	2.4 \pm 0.3 ^{abd}
	Embrión	0.7 \pm 0.4	1.1 \pm 0.6 ^a	1.2 \pm 0.5 ^{ad}
(+)ABZSO	Madre	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2 ^c	1.8 \pm 0.3 ^{bd}
	Embrión	0.6 \pm 0.3	0.7 \pm 0.4	1.0 \pm 0.4 ^d
ABZSO ₂	Madre	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1 ^c	0.9 \pm 0.2 ^{bd}
	Embrión	0.3 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2 ^d

Valores dados como media \pm DS (n=6).

- a. Diferencias significativas entre los enantiómeros dentro del mismo tratamiento.
- b. Diferencias significativas entre madres y fetos.
- c. Diferencias significativas entre la dosis de 10 y la de 14 mg/kg.
- d. Diferencias significativas respecto a la dosis de 8.5 mg/kg.

Las concentraciones plasmáticas maternas y embrionarias de cada una de las sustancias analizadas fueron similares cuando se administraron las dosis de 8.5 y 10 mg/kg. En cambio, tras la dosis de 14 mg/kg, las concentraciones embrionarias sólo alcanzaron la mitad de las maternas.

Tras la dosis de 8.5 mg/kg se observó que las concentraciones plasmáticas maternas y embrionarias del (-)-ABZSO eran significativamente superiores a las de (+)-ABZSO. En la dosis de 10 mg/kg, se observaron concentraciones plasmáticas similares, mientras que en el embrión el (-)-ABZSO es el que mayores concentraciones presentaba. En este caso, las

concentraciones maternas, también fueron similares a las embrionarias. Al aumentar la dosis a 14 mg/kg, las concentraciones del (+)-ABZSO fueron menores a las de (-)-ABZSO, tanto en las madres como en los embriones. Comparando las concentraciones observadas tras la administración de una dosis de 10mg/kg y de 14 mg/kg, se observa que éstas son significativamente superiores cuando se administra una dosis de 14 mg/kg, no obstante las concentraciones embrionarias son similares.

5. Estudio de la embriotoxicidad y teratogenia del ABZSO en ratas

En la Tabla 9 se han reseñado los resultados correspondientes a los efectos embriotóxicos y teratógenos evaluados tras los tratamientos a ratas gestantes con rac-ABZSO. En ella se puede observar un aumento de las reabsorciones cuando se administró la dosis de 10 mg/kg con respecto a la administración de la dosis de 8.5 mg/kg. La dosis de 14 mg/kg indujo la reabsorción de todos los fetos, presentando diferencias significativas con las otras dos dosis. El mismo resultado fue observado en relación con el número de fetos vivos por camada, en este caso, es posible observar que el porcentaje de fetos vivos disminuye en respuesta al tratamiento. También el peso fetal tiende a disminuir con el aumento de la dosis.

Después de la extracción de los fetos a los 20 días de gestación, se observaron una serie de animales con malformaciones congénitas. Ningún feto control presentó malformaciones externas. En el grupo tratado con la dosis de 8.5 mg/kg, estas malformaciones fueron muy bajas (0.7%), observándose solamente un feto con cola corta.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre la dosis de 8.5 y el grupo control. Sin embargo, éstas se incrementaron significativamente con la dosis de 10 mg/kg produciéndose un 19% más de malformaciones que con la dosis de 8.5 mg/kg. Las malformaciones externas más frecuentes en los tratamientos fueron los defectos en la cola y las atresias anales. Las anomalías en la cola consistían en fetos sin cola, aparición de colas cortas y/o curvadas. En casi todos los casos, la atresia anal y la agenesia caudal estaban siempre asociadas. También fueron encontradas mayores malformaciones externas como la toracosquisis con ectopia cordis (Figura 13), hidrocefalia y malformaciones en los miembros.

Respecto a las malformaciones esqueléticas, los defectos en el esternón, metacarpo y falanges fueron las más comunes. El porcentaje de las malformaciones esqueléticas en los grupos tratados fue significativamente elevado respecto al grupo control, afectando cerca de 90% de los fetos en los animales tratados con 10 mg/kg. En el grupo control fueron observadas algunas malformaciones menores como variaciones en el número de vértebras, mientras que los fetos de animales tratados presentaban malformaciones mayores de tipo vertebral, costal y de los miembros.

En la Tabla 9 se especifica el porcentaje de fetos con malformaciones esqueléticas y más concretamente las vertebrales y costales. El porcentaje de malformaciones esqueléticas observadas con la dosis más baja no presentó diferencias significativas con el control, sin embargo, estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre la dosis de 10 mg/kg y el grupo control y la dosis más baja. Las principales malformaciones vertebrales observadas consistían en hemivértebra, agenesia del cuerpo vertebral, y cuerpos vertebrales fusionados o bilobulados (Figura 12). Dos fetos tratados con 10 mg/kg de ABZSO también presentaron espina bífida.

Tabla 9. Efecto del ABZSO sobre el desarrollo fetal en ratas.

Observaciones	Dosis (mg/kg)			
	0	8.5	10	14
Número de camadas	6.0	8	6.0	6.0
Número de implantaciones/camada	18.5 ± 1.5	18.3 ± 0.9	18.4 ± 1.3	18.8 ± 1.1
Número de reabsorciones tempranas/camada	3.3 ± 1.6	2.8 ± 0.9	3.4 ± 1.1	4.5 ± 1.9
Número de reabsorciones tardías/camada	1.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	2.4 ± 1.3	14.3 ± 2.5
% reabsorciones totales/camada	17.5 ± 6.5	16.3 ± 4.3	45.7 ± 12.3	100.0 ± 0.0 ^b
% de fetos vivos/camada	88.4 ± 5.5	86.7 ± 4.3	54.3 ± 12.3	0.0 ± 0.0 ^b
Peso fetal (g)	5.4 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.1 ± 0.1	-
% fetos con malformaciones externas	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.7	26.0 ± 12.5 ^a	-
% fetos con malformaciones esqueléticas	12.5 ± 4.2	26.7 ± 7.6	90.9 ± 7.3 ^a	-
% fetos con malformaciones vertebrales	12.5 ± 4.2	22.6 ± 7.7	87.1 ± 9.2 ^a	-
% fetos con malformaciones costales	0.0 ± 0.0	4.1 ± 1.8	72.6 ± 14.3 ^a	-

Valores dados como media ± SEM

a. Diferencias significativas con el grupo control y con la dosis de 8.5 mg/kg.

b. Diferencias significativas con grupo control y las dosis de 8.5 y 10 mg/kg.

Las malformaciones costales más frecuentes fueron fusiones de varias costillas (Figura 14), aunque también se observaron otros defectos como costillas rudimentarias o agenesias costales. Algunos fetos presentaron malformaciones mayores de los miembros a nivel de la escápula, húmero, fémur, o tibia y agenesia de tibia y cúbito (Figura 15). En este caso la

agenesia de la tibia estaba asociada a un peroné angulado y a una malformación de los dedos mediales del pie.

Leyenda de las figuras 12-15

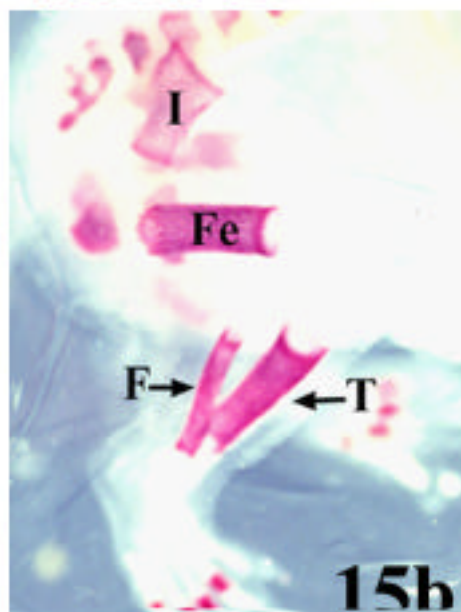
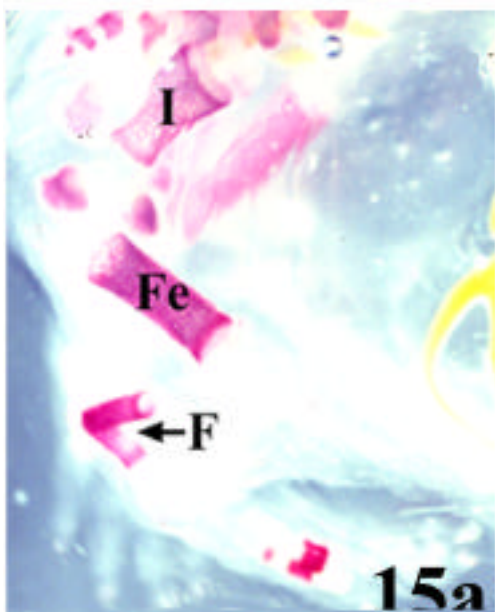
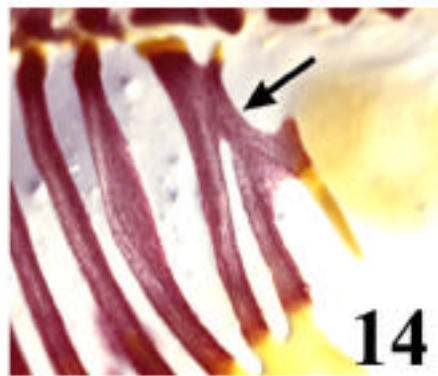
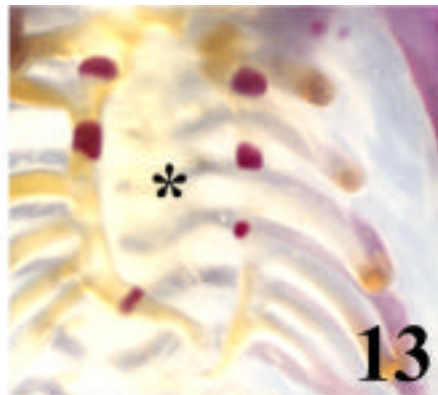
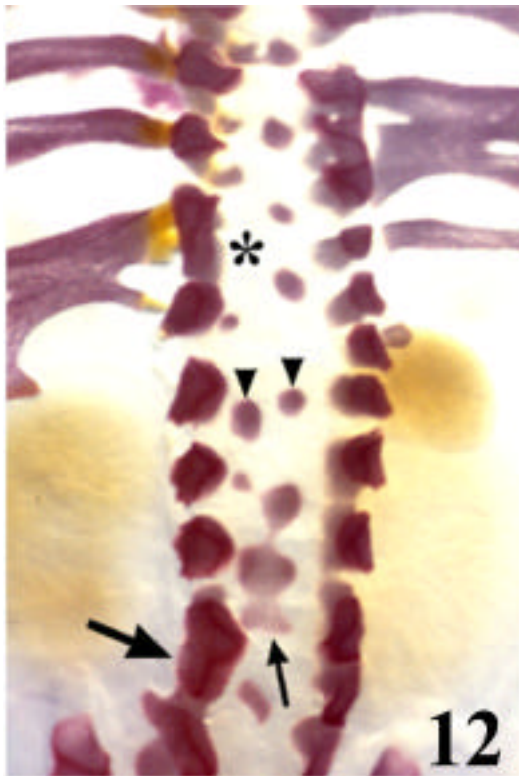
Figura 12: Malformación vertebral observada en un feto tratado con 10 mg/kg de ABZSO. Fusión de los arcos de las vértebras (flecha grande). Fusión de varios cuerpos vertebrales (flecha pequeña). Hemivértebra bilateral asimétrica (cabezas de flecha). Agenesia de los cuerpos de las vértebras (*).

Figura 13: Esternosquisis (*) observada en un feto de animal tratado con 10 mg/kg de ABZSO. Esta malformación esquelética fue observada externamente como una toracosquisis con ectopia cordis.

Figura 14: Fusión múltiple entre varias costillas (flecha) observada en un feto tratado con 10 mg/kg de ABZSO.

Figura 15a: Malformación de un miembro pelviano observada en un feto tratado con 10 mg/kg de ABZSO. En este caso se puede observar una agenesia de la tibia asociada a un peroné angulado. I: Ílion; Fe: Fémur; F: Peroné.

Figura 15b: Miembro pelviano normal de un feto tratado con 10 mg/kg de ABZSO. I: Ílion; Fe: Fémur; F: Peroné; T: Tibia.



6. Estudio del perfil cinético de los enantiómeros de ABZSO en ratas

En la Figura 16A se pueden observar las concentraciones plasmáticas medias del (+)-ABZSO obtenidas tras los tratamientos a las ratas con una dosis de 10 mg/kg de rac-ABZSO o 5 mg/kg de (+)-ABZSO. En la Figura 16B se pueden observar las concentraciones plasmáticas medias del (-)-ABZSO obtenidas tras los tratamientos a ratas con una dosis de 10 mg/kg de rac-ABZSO o 5 mg/kg de (-)-ABZSO. En ambos casos se puede observar que las concentraciones

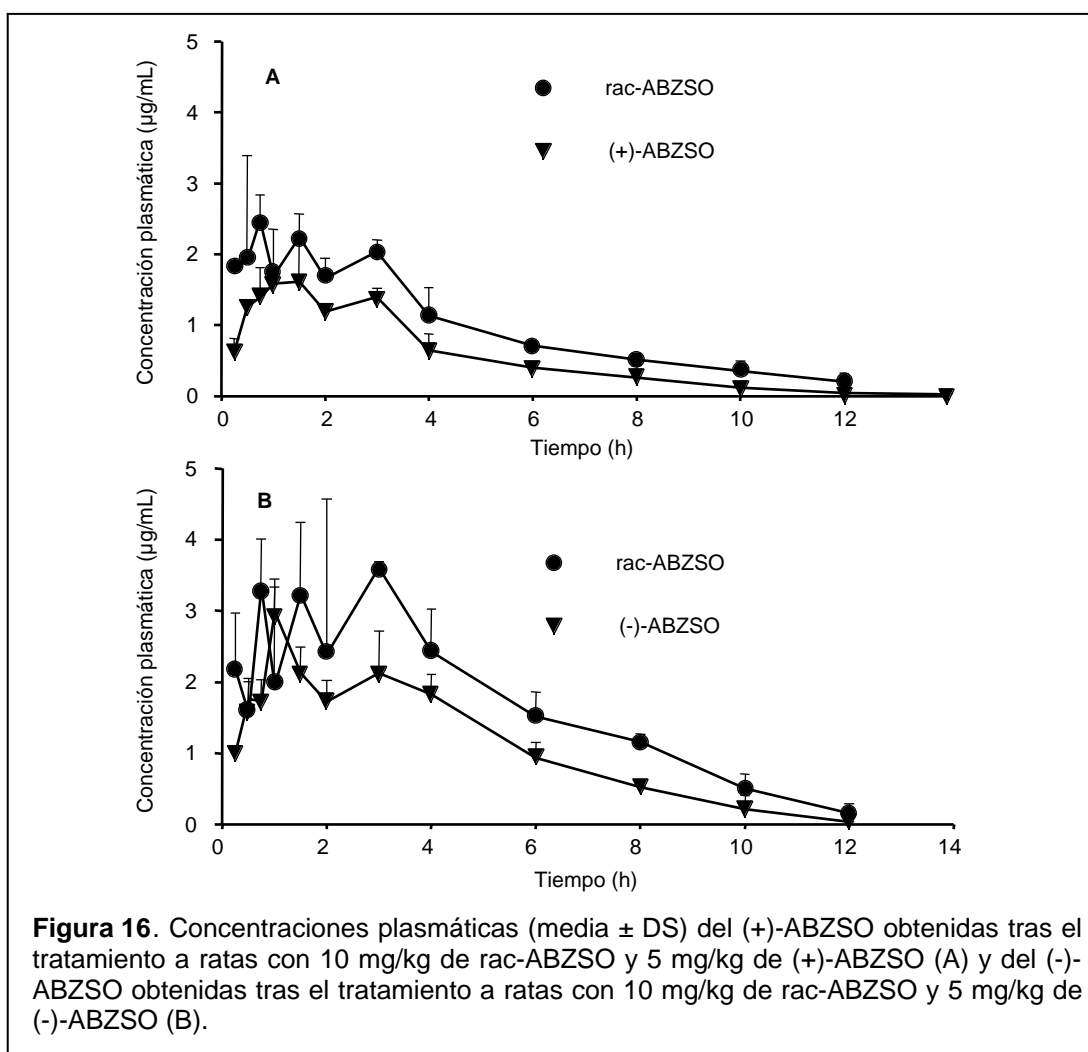


Figura 16. Concentraciones plasmáticas (media \pm DS) del (+)-ABZSO obtenidas tras el tratamiento a ratas con 10 mg/kg de rac-ABZSO y 5 mg/kg de (+)-ABZSO (A) y del (-)-ABZSO obtenidas tras el tratamiento a ratas con 10 mg/kg de rac-ABZSO y 5 mg/kg de (-)-ABZSO (B).

plasmáticas medias obtenidas, tanto para (+)-ABZSO como para (-)-ABZSO en el tratamiento con la forma racémica, son superiores a las obtenidas tras el tratamiento con los enantiómeros por separado. Como se puede observar, los perfiles del (+)-ABZSO y del (-)-ABZSO siguen curvas paralelas, tanto si se administran solos como en forma racémica.

Las concentraciones observadas de (-)-ABZSO fueron superiores a las de (+)-ABZSO tanto en la administración de la forma racémica como de los enantiómeros por separado. Este hecho se ve reflejado en los parámetros cinéticos calculados para las respectivas curvas concentración-tiempo descritos en la Tabla 10. Tras la administración de la forma racémica, los valores de las AUC fueron superiores para el (-)-ABZSO (19.7 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) que para el (+)-ABZSO (11.6 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). Las C_{max} del (-)-ABZSO fueron superiores a las del (+)-ABZSO. En todos los casos, los valores de MRT observados para los enantiómeros, tanto en la administración de la forma racémica como de los enantiómeros por separado, fueron similares.

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos correspondientes al ABZSO-total, (+)-ABZSO, (-)-ABZSO y ABZSO₂, obtenidos tras la administración oral de 10 mg/kg de rac-ABZSO, de 5 mg/kg de (+)-ABZSO o de 5 mg/kg (-)-ABZSO a ratas.

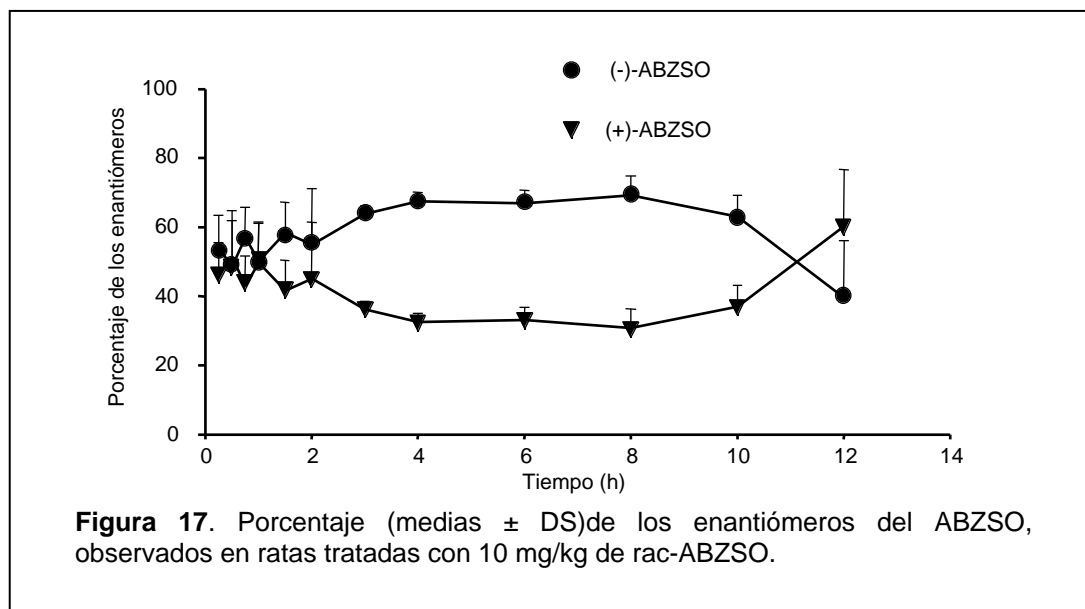
		C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T_{max} (h)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	MRT (h)
	ABZSO-total	5.8 \pm 0.3	0.75	31.3	4
10 mg/kg rac-ABZSO	(+)-ABZSO	2.5 \pm 0.4	0.75	11.6	3.6
	(-)-ABZSO	3.6 \pm 0.1	3	19.7	4.1
	ABZSO₂	0.7 \pm 0.0	3	5.2	5.5
5mg/kg (+)-ABZSO	(+)-ABZSO	1.6 \pm 0.9	1.5	7	3.6
	ABZSO₂	0.2 \pm 0.0	3	1.6	4
5mg/kg (-)-ABZSO	(-)-ABZSO	3.0 \pm 0.4	1	12.9	3.7
	ABZSO₂	0.3 \pm 0.1	4	2.8	5.7

Valores dados como media \pm DS (n=3)

Las AUC obtenidas tras la administración de los enantiómeros por separado fueron inferiores a

las obtenidas tras la administración de la forma racémica. Al igual que tras la administración del racémico las AUC del (+)-ABZSO fueron menores que las obtenidas por el (-)-ABZSO cuando se administran por separado.

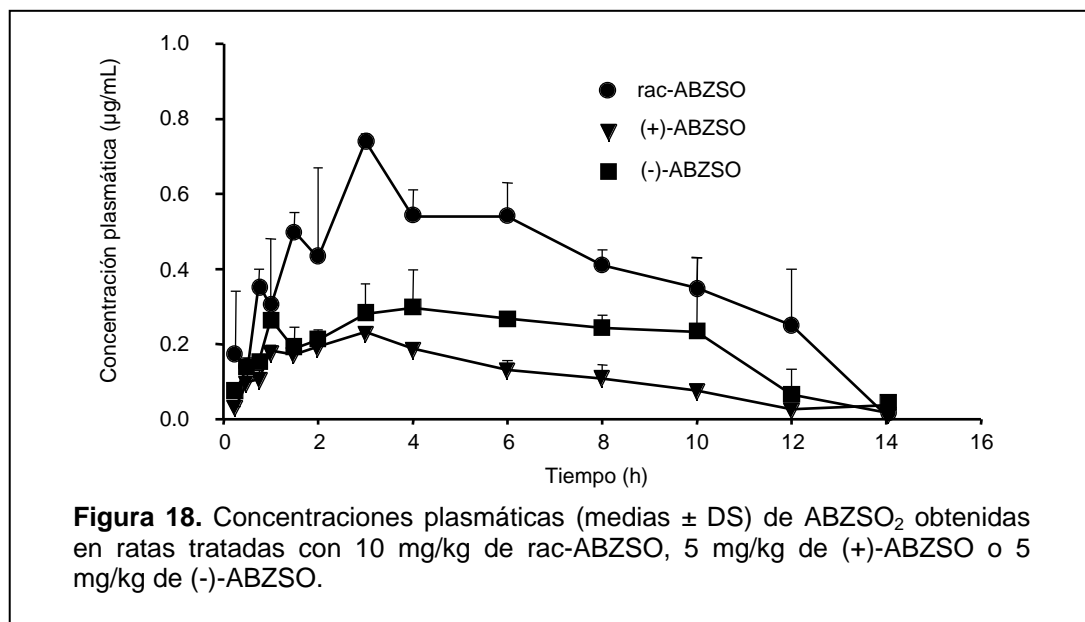
En la Figura 17, está representada la evolución de los enantiómeros con el tiempo tras la administración a ratas de 10 mg rac-ABZSO/kg. En ella se observa que en los primeros minutos las proporciones de ambos enantiómeros se mantienen en la forma racémica. Con el tiempo las del (-)-ABZSO aumentan respecto al (+)-ABZSO. Sin embargo, en las últimas horas, es el enantiómero positivo el que se presenta en mayores proporciones, aunque las concentraciones plasmáticas a estos tiempos son ya muy bajas y cercanas al límite de cuantificación de la técnica analítica.



En ninguna de las muestras de plasma analizadas tras la administración de los enantiómeros por separado se detectó el enantiómero contrario al administrado. Las proporciones encontradas fueron del 100% indicando que no existe inversión quiral *in vivo*.

En la Figura 18 están representados los perfiles cinéticos del metabolito ABZSO₂, obtenidos tras la administración del rac-ABZSO o de cada uno de sus enantiómeros por separado a ratas. En ella se puede observar que las concentraciones alcanzadas tras el tratamiento con la forma

racémica son superiores (el doble) de las obtenidas después del tratamiento con los enantiómeros.



Al analizar los parámetros correspondientes al ABZSO₂, las AUC observadas (Tabla 10) fueron superiores cuando se administró el enantiómero negativo respecto al positivo. El MRT del ABZSO₂ obtenido tras los tres tratamientos fueron similares. El AUC encontrado en el tratamiento con el (-)-ABZSO fue superior respecto al encontrado en el tratamiento con el (+)-ABZSO.

En los estudios *in vivo*, la mejor manera de valorar el metabolismo del ABZSO es a través del cálculo de la relación de las AUCs entre el ABZSO y ABZSO₂. Así, tras el tratamiento con la forma racémica la relación ABZSO-total/ABZSO₂ fue de 6.0; mientras que en el tratamiento con el positivo y con el negativo, la relación ABZSO/ABZSO₂ fueron similares entre ambos tratamientos con valores de 4.4 y 4.6 tras administración del (+)-ABZSO y (-)-ABZSO, respectivamente.

Por otra parte, la relación de las AUC entre los enantiómeros obtenidos cuando son administrados por separado con los obtenidos cuando se administra la forma racémica nos da

la idea bioequivalencia de éstos. La relación de la AUC del (+)-ABZSO fue de 60.3 % mientras que del negativo fue de 65.5%. La relación entre las AUC (+)-ABZSO/(-)-ABZSO fue de 0.54 cuando son administrados por separado y de 0.58 en su forma racémica.

Discusión

1. Caracterización farmacocinética del ABZSO y sus enantiómeros en rumiantes

Los BZD se administran generalmente a los animales por vía oral, por tanto, los fluidos gastrointestinales son los primeros que interaccionan con el fármaco. Estudios preliminares realizados *in vitro* en los que se incubaron ABZ y ABZSO en fluidos gastrointestinales de rumiantes se pudo observar la existencia en este medio de procesos metabólicos de oxidación y reducción. Este metabolismo sin ninguna duda repercute en la eficacia, en primer lugar a nivel intestinal, de estos productos y consecuentemente condiciona la cinética plasmática, la disposición tisular y la eficacia y toxicidad a nivel sistémico de estos compuestos.

En los animales rumiantes, estos fenómenos son particularmente críticos ya que el rumen desempeña un papel muy importante como fermentador debido a su elevado contenido microbiano, que participa directamente en muchas reacciones metabólicas. Su medio es bastante reductor (potencial reductor de -350 mV; (Clarke, 1977)), lo cual facilita la acción fermentadora de las bacterias y protozoos, favoreciendo la eficacia de las reacciones químicas mediadas por estos microorganismos. Además, la flora microbiana gastrointestinal puede biotransformar los xenobióticos y particularmente a los que contienen el grupo nitro o sulfóxido en su molécula (Rowland, 1986), como es el caso de las moléculas objeto del estudio (NTB, ABZ, ABZSO). Bajo estos factores cabe esperar una rápida y eficiente reducción de los fármacos que poseen en su estructura este tipo de grupos, cuando se administran por vía oral. En el presente estudio, con la utilización de un modelo de rumen artificial y por tanto en condiciones anaerobias, se observó una eficiente nitroreducción del NTB a ABZ y una sulforeducción del ABZSO a ABZ. Contrariamente, los procesos de oxidación de ABZ a ABZSO y de ABZSO a ABZSO₂ fueron bastante lentos y poco eficientes, lo que podría estar relacionado con la baja capacidad oxidativa del fluido ruminal. Después de la incubación de cada una de las tres moléculas objeto de este estudio, el ABZ fue el que estuvo presente en mayores proporciones en los fluidos ruminales, con concentraciones máximas 4 h después del inicio de la incubación del NTB y del ABZSO, este compuesto fue el que presentó unos valores de AUC más elevados. Estos resultados sugieren que los procesos reductores son los que predominan y que la flora bacteriana podría ser la responsable de estas reducciones.

Los bajos niveles de todos los compuestos obtenidos tras la incubación del ABZSO podrían ser debido a una baja solubilidad en los fluidos ruminales debido al elevado pH del medio o a una mayor adhesión del fármaco a las partículas del fluido ruminal, lo que llevaría a una disminución de la disponibilidad del fármaco para ser biotransformado.

El paso de ABZ a ABZSO y de éste a ABZSO₂ se produce en unas tasas muy limitadas. Cuando se incubaba NTB, el ABZSO se forma en bajas cantidades (cuatro veces más ABZ que ABZSO) y prácticamente no aparece ABZSO₂; algo semejante se puede observar en la incubación con ABZ, este se oxida en bajas tasas y tampoco aparece la sulfona. Tampoco se observó un nivel significativo de oxidación en la incubación del ABZSO, ya que se producía una cantidad de ABZSO₂ muy baja.

Todo parece indicar que la reacción de oxidoreducción entre el ABZ y el ABZSO producida por los microorganismos ruminales es reversible y que está desplazada en un porcentaje muy elevado en el sentido de la reducción. Estos resultados revelan que la acción metabólica de la flora ruminal favorece la producción de los compuestos con más actividad farmacológica (ABZ) y que la producción del metabolito con baja actividad antihelmíntica (ABZSO₂) es casi nula. Los resultados obtenidos sugieren que, en rumiantes, los procesos de reducción del NTB y del ABZSO predominantemente ocurren en los fluidos gastrointestinales, mientras que los procesos de oxidación del ABZ y del ABZSO ocurren básicamente a nivel hepático (Galtier y cols., 1986; Lanusse y cols., 1993b; Souhaili El-Amri y cols., 1987).

La ineficacia de los procesos oxidativos en los fluidos ruminales también ha sido observada para otros BZD (Beretta y cols., 1987). Estos autores observaron que la oxidación del fenbendazol al sulfóxido correspondiente era menos eficaz que la reducción del sulfóxido a fenbendazol.

Los resultados observados en este estudio son similares a los descritos por Lanusse y cols.(1992a;b), cuando incubaron estos compuestos, en condiciones anaerobias, en fluidos ruminales e ileales de ovejas y terneras. Estos autores demostraron la incapacidad de los fluidos ruminales hervidos para realizar la biotransformación de estos compuestos, lo que sugiere que, en el rumen, los microorganismos ruminales son los responsables de la degradación metabólica de los fármacos. No obstante, poco se sabe sobre los

microorganismos que intervienen en las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el rumen y como se producen. Se han descrito nitroreducciones, con el paso de nitrato a nitrito (Anderson y cols., 1996). Probablemente estas pueden ser similares a la nitroreducción que ocurre en la biotransformación de NTB a ABZ.

No hay en la literatura datos respecto a la enantioselectividad del metabolismo ruminal. Al analizar el comportamiento de los enantiómeros del ABZSO se observó que su perfil era similar en todas las incubaciones. Las AUC obtenidas para cada enantiómero no fueron significativamente diferentes entre ellas en los tres estudios realizados. No obstante, en la incubación con rac-ABZSO se observó que durante las dos primeras horas, el porcentaje de (-)-ABZSO era relativamente inferior al (+)-ABZSO. Esta diferencia podría ser debida a una mayor afinidad del (-)-ABZSO para con los enzimas responsables de la formación del metabolito ABZSO₂, ya que se puede observar una coincidencia en el tiempo de la aparición del metabolito ABZSO₂ con la disminución inicial del porcentaje de (-)-ABZSO. Además se puede observar que a partir de las 2 h de incubación las concentraciones de ABZSO₂ se mantienen constantes. La recuperación posterior del porcentaje del (-)-ABZSO se podría atribuir a su reducción produciendo ABZ y a la reoxidación a ABZSO. La similitud en las concentraciones de los enantiómeros sugiere que las reacciones de oxido-reducción que sufre el ABZ y el ABZSO debido a la flora microbiana no son enantioselectivas. No obstante, es posible que las diferentes reacciones que tiene lugar en la incubación de estos productos, enmascaren posibles procesos selectivos, compensado de este modo las AUC de los enantiómeros.

Redondo y cols. (1999) han descrito la cinética de formación de los enantiómeros de ABZSO a partir de la incubación del ABZ en microsomas obtenidos a partir de enterocitos. Los datos obtenidos por estos autores no indican diferencias en la formación o eliminación de ambos enantiómeros, sugiriendo que estos procesos metabólicos no son enantioselectivos. Esto sugiere que las diferencias en el perfil cinético de los enantiómeros de ABZSO observadas en estudios *in vivo* (Benoit y cols., 1992; Delatour y cols., 1990b; Delatour y cols., 1991b) deberían atribuirse a una posible enantioselectividad en el metabolismo hepático como lo sugieren varios autores (Benoit y cols., 1992; Solana y cols., 2000; Virkel y cols., 2000).

La elevada presencia del ABZ en los fluidos ruminales tras la incubación de las tres moléculas

objeto de este estudio implica una persistencia de la actividad antihelmíntica de este fármaco en los tratamientos, cuando estos se realizan en rumiantes. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que el ABZ posee elevada afinidad para con los parásitos intestinales (Álvarez y cols., 1999; Oxberry y cols., 2000) y elevada actividad antihelmíntica (Lubega y Prichard, 1991b; Pérez-Serrano y cols., 1997), lo cual sugiere que, después del tratamiento con NTB, ABZ, ABZSO, los parásitos intestinales son eliminados por el efecto sinérgico del ABZ y del ABZSO.

Los estudios *in vitro* realizados por diferentes autores y que se han referenciado en los apartados anteriores, no regulaban constantemente el pH, ni el efecto de la alimentación (simulación de la salida hacia el abomaso del contenido ruminal y la entrada de alimento), elementos que tienen una influencia significativa en los procesos biotransformadores de la flora bacteriana. El modelo de rumen artificial utilizado en este estudio ha permitido demostrar que el sistema de fermentadores de doble flujo es un modelo válido para estudiar el metabolismo ruminal de los fármacos, puesto que permite controlar todos los factores que pueden modificar el metabolismo como el pH, alimentación, condiciones anaerobias, temperatura, etc.

Algunos estudios realizados por Virkel y cols. (1999) han demostrado que las variaciones de la dieta alteraban los procesos metabólicos de los BZD, siendo la reducción del NTB a ABZ y de ABZSO a ABZ mayor en los fluidos provenientes de los animales alimentados con concentrado que alimentados con forraje. Es posible que estas variaciones también puedan influir en el metabolismo de los enantiómeros, por lo que se requieren estudios posteriores sobre el metabolismo de los enantiómeros de ABZSO cuando se modifican la dieta y el pH ruminal.

Paralelamente a los estudios *in vitro*, se realizaron los estudios *in vivo* administrando a ovejas machos y hembras el rac-ABZSO para poder estudiar el perfil cinético de los enantiómeros y correlacionarlos con los datos obtenidos *in vitro* y evaluar el papel del metabolismo ruminal y hepático en la disposición de estos fármacos en el organismo.

Tras la administración oral de rac-ABZSO a ovejas machos y hembras se ha podido observar que el ABZSO-total se detecta en el plasma durante los primeros 30 min postadministración presentando una lenta absorción alcanzándose las C_{max} entorno a las 12 h. Esta lenta absorción, observada en ambos sexos, se podría relacionar con la baja solubilidad que los BZD

presentan en los fluidos gastrointestinales, y que condiciona su absorción (Baggot y McKellar, 1994; Lanusse y Prichard, 1993); efecto que también se ha observado en los estudios *in vitro* en rumenes artificiales. Por otra parte la existencia de una circulación enteroplasmática que prolonga la presencia del fármaco en el tracto gastrointestinal también justificaría este fenómeno (Lanusse y Prichard, 1993). Hay que tener en cuenta que el ABZSO se une a las partículas del contenido gastrointestinal y además como se ha observado en los estudios *in vitro*, este fármaco es reducido por la flora gastrointestinal a ABZ, haciendo que parte del ABZSO detectado en la sangre, sea resultado del efecto de primer paso que presenta el ABZ formado a nivel gastrointestinal. Este complejo proceso podría ser responsable de que las C_{max} del ABZSO se alcancen, en ambos sexos, después de 12 horas de su administración. Los valores de T_{max} del ABZSO fueron algo más largos que los observados también en ovejas, tras la administración de NTB por Cristòfol y cols (1998) o de ABZ por Lanusse y cols. (1995). Estos datos sugieren que la biotransformación ruminal de NTB a ABZ y el metabolismo hepático del ABZ son bastante rápidos dando lugar al ABZSO que se encuentra en los primeros minutos circulando ya por el organismo.

El MRT, tanto en los machos como en hembras, fue superior (4-6 h) al observado cuando se administraba NTB. Esta diferencia de valores podría ser debida a la baja solubilidad del ABZSO en los fluidos gastrointestinales que justificaría el retraso en el proceso de absorción y que podría condicionar también la eliminación, dando lugar a MRT más largos.

En estudios realizados con NTB, fueron encontradas diferencias entre sexos en la eliminación del ABZSO, presentado las hembras mayores valores de MRT y t_{1/2} que los machos (Cristòfol y cols., 1998). Estos autores atribuían la más rápida eliminación del ABZSO, en los machos, a la acción de hormonas sexuales, como la testosterona, que podría inducir el metabolismo del ABZSO en estos, a través de la inducción del Cit. P450, responsable del metabolismo microsomal del ABZSO a ABZSO₂. Estas diferencias en la eliminación del ABZSO no fueron observadas en el presente estudio. El hecho de que el ABZSO se difunda desde la sangre al lumen ruminal y intestinal, donde bajo la acción de la flora bacteriana es metabolizado, y la lenta absorción del ABZSO desde el tracto gastrointestinal podrían enmascarar el efecto de las hormonas sobre su metabolismo hepático.

El perfil del ABZSO₂ entre machos y hembras fue similar, alcanzándose T_{max} al rededor de las

30 h postadministración, lo que indica que su formación ocurre con cierta lentitud. Por otro lado, al analizar el perfil plasmático se observa que las concentraciones de ABZSO₂ son similares en el periodo entre las 24 y 36 horas, siendo en todos los casos inferiores a 1 µg /mL. Datos similares fueron observados por otros autores (Cristòfol y cols., 1998; Lanusse y cols., 1995; Swarnkar y cols., 1998). Las bajas concentraciones de ABZSO observadas en el presente estudio y la lentitud en que se obtienen también ha sido descrita en otras especies animales como es el caso de terneras (Lanusse y cols., 1991), cabras (Benchaoui y cols., 1993) y cerdos (Álvarez y cols., 1996), lo que indica que en general, la capacidad de sulfonación del ABZSO por parte de las enzimas hepáticas es limitada.

Al comparar los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el ABZSO₂ entre machos y hembras no se encontraron diferencias significativas. Estos datos contrastan con los obtenidos por Cristòfol y cols (1998). Estos autores observaron en ovejas tratadas con NTB que las C_{max} para el ABZSO₂, eran más bajas en las hembras que en los machos. Además, estos autores observaron que las hembras eliminaban más lentamente este metabolito con lo que sugerían que dichas diferencias se podrían atribuir a una inducción metabólica de la eliminación de la sulfona por parte de las hormonas sexuales y a diferencias en la unión a las proteínas plasmáticas (albúminas y globulinas) del ABZSO y ABZSO₂. Esta unión era más baja en los machos que en las hembras, factor que favorecería la eliminación al existir más fracción de fármaco libre en los machos que en las hembras.

La evolución del perfil de la cinética plasmática de los enantiómeros demuestra que en los primeros minutos la proporción de ambos es similar en ambos sexos. Con el paso del tiempo, el porcentaje del (+)-ABZSO aumenta significativamente, alcanzando a las 60 h, valores de más de un 95% del ABZSO-total respecto al (-)-ABZSO. Este predominio se ve reflejado en las AUC obtenidas, donde (+)-ABZSO representa un 85.3% y un 80.0 % del ABZSO-total en machos y hembras, respectivamente. Teniendo en cuenta que, como se ha observado en el estudio *in vitro* en rúmenes artificiales, el metabolismo ruminal del ABZSO no es enantioselectivo, el alto porcentaje del (+)-ABZSO observado, y la rápida eliminación del (-)-ABZSO, sugiere que podría existir una enantioselectividad metabólica favorable al (-)-ABZSO por parte del sistema enzimático Cit. P450. Como resultado se observaron valores de MRT inferiores para el (-)-ABZSO. La enantioselectividad en la sulfonación ha sido sugerida por

Benoit y cols (1992) al observar que cuando se inducía el metabolismo del ABZSO a través de la administración de dosis sucesivas de ABZ a cabras, disminuían las concentraciones de (-)-ABZSO a medida que aumentaban las del ABZSO₂, sugiriendo un consumo selectivo del (-)-ABZSO por parte del Cit. P450. Esto también ha sido sugerido por Cristòfol y cols. (2000) en un estudio en el que se administró a terneras este fármaco por vía intravenosa y subcutánea. Estos autores observaron que el (-)-ABZSO presentaba valores de AUC, y t_{1/2} cercanos a la mitad de los observados para el (+)-ABZSO.

Después de la administración de ABZ a terneros, cabras y ovejas también se ha observado que el (+)-ABZSO es el predominante en el plasma (Delatour y cols., 1991b). Según estos autores, el predominio del (+)-ABZSO, en la administración del ABZ, era debido a una selectividad en la sulfoxidación del ABZ favorable a la formación del (+)-ABZSO. En los estudios *in vitro* se ha podido observar la formación ruminal de ABZ a partir del ABZSO, por lo cual este proceso podría condicionar la posterior formación a nivel hepático de nuevo sulfóxido y por tanto de cada uno de los dos enantiómeros, favoreciéndose la formación de (+)-ABZSO. Con esto, se puede sugerir que la enantioselectividad ocurriría a nivel de la sulfoxidación donde se formaría mayoritariamente el (+)-ABZSO y en la sulfonación favoreciendo la eliminación selectiva del (-)-ABZSO por parte del Cit. P450. También hay que tener en cuenta que este fármaco y sus metabolitos son principalmente excretados por vía renal (Gyurik y cols., 1981; Hennessy y cols., 1989) y la excreción renal puede presentar diferencias entre enantiómeros. Se desconoce si la excreción renal difiere entre los dos enantiómeros del ABZSO. En la literatura, varios son los estudios que ponen en evidencia las diferencias en el comportamiento cinético de los enantiómeros provocadas por diferencias en los procesos metabólicos y en la eliminación renal. Por ejemplo, el enantiómero negativo de tocinide se excreta más por vía renal que el positivo (Nerurkar y cols., 1992); la warfarina, anticoagulante con estructura quiral, presentó una depuración del S (-) mayor que la del R(+) (Takahashi y cols., 1998). Estos autores demostraron que había isoenzimas específicas para el metabolismo de cada uno de los enantiómeros tal y como se ha sugerido para la sulfoxidación del ABZ.

La predominancia del (+)-ABZSO frente al (-)-ABZSO y sus elevadas concentraciones en los animales tratados con rac-ABZSO, sugiere que éste isómero podría ser el principal responsable de la actividad antiparasitaria ya que reside en los tejidos de los animales tratados más tiempo y en mayores concentraciones. Además, alcanza en los parásitos proporciones

similares a las plasmáticas (Álvarez y cols., 2000), sin existir metabolismo enantioselectivo en los parásitos (Solana y cols., 2001). Sin embargo, la actividad antiparasitaria de cada uno de los enantiómeros del ABZSO requiere futuros estudios ya que no siempre los dos enantiómeros tienen la misma actividad farmacológica.

2. Estudio del paso placentario del ABZSO y sus enantiómeros en ovejas y ratas. Análisis de la embriotoxicidad en la rata

Durante la gestación, la administración de fármacos comporta una serie de riesgos derivados de la capacidad que tienen estos para atravesar la barrera placentaria y alcanzar el feto o el embrión en concentraciones significativas. Dicha capacidad depende de las características fisicoquímicas de su molécula, de la permeabilidad de la placenta y del posible metabolismo placentario. Algunas de estas moléculas pueden afectar el correcto desarrollo embrionario llegando a causar muerte embrionaria y malformaciones congénitas. Por ejemplo, las malformaciones que se observaron en los hijos de mujeres tratadas con talidomida durante el primer tercio de gestación, en los años 60, se habría evitado si se hubiera utilizado uno de los enantiómeros, ya que el R-enantiómero es sedante y el S-enantiómero es teratógeno (Testa y cols., 1993). En la literatura hay muchos datos que demuestran que la mayoría de los fármacos BZD, son capaces de causar malformaciones congénitas cuando se administran a animales durante la gestación (Cristòfol y cols., 1997b; Delatour y cols., 1984; Navarro y cols., 1999; Navarro y cols., 1998). En el caso del ABZ, estos efectos se han atribuido mayoritariamente al ABZSO por ser un metabolito activo con capacidad para llegar al embrión en concentraciones elevadas (Cristòfol y cols., 1995; 1997b). No obstante se desconoce como se produce el acceso de sus enantiómeros hasta el feto o el embrión. En esta parte del estudio se ha evaluado la capacidad de ambos para atravesar los tejidos placentarios, y acceder al embrión o al feto en ratas y ovejas gestantes, respectivamente.

Después de la administración a ovejas en el cuarto mes de gestación, de una dosis terapéutica por vía oral de rac-ABZSO, ambos enantiómeros y el metabolito ABZSO₂ se detectaron en la sangre materna hasta las 40 h postadministración. El perfil cinético de ABZSO-total, sus enantiómeros y ABZSO₂, fue similar al observado en las ovejas hembras no gestantes, elemento que pone de relieve que la gestación no afecta a la disposición en el organismo de

estos productos. Resultados similares fueron observados con NTB por Cristòfol y cols. (1997a). Las variaciones fisiológicas que se presentan durante la gestación, comportan alteraciones en el contenido de proteínas plasmáticas, ácidos grasos, aumento del agua corporal, elementos que pueden alterar la unión del fármaco a las proteínas y su volumen de distribución, afectando de esta forma el perfil cinético de estos compuestos. Por otra parte, es conocido que el metabolismo hepático a nivel del Cit. P450 puede verse modificado por la presencia de progesterona que podría interaccionar con el metabolismo de los BZD. No obstante en este estudio no se han observado diferencias en los parámetros cinéticos estudiados, esto podría ser debido al complicado ciclo metabólico, digestivo y hepático de estos compuestos, que ya se ha descrito en el apartado anterior, el cual podría enmascarar los cambios, si es que se producen por causa de la gestación. Numerosos autores han descrito modificaciones en la cinética de los fármacos durante la gestación, así el fenobarbital, presenta una depuración más rápida durante la gestación, debido a un posible aumento de la actividad metabólica (Högstedt y cols., 1985), y la teofilina es eliminada más lentamente debido a una posible inhibición de su metabolismo hepático (Gardner y cols., 1987).

Los resultados obtenidos ponen de relieve la capacidad de estas moléculas para atravesar la barrera placentaria y alcanzar el feto en concentraciones significativas. Las concentraciones fetales de las distintas sustancias objeto de este estudio, fueron cercanas a la mitad de las encontradas en la sangre materna, lo cual sugiere que las membranas placentarias reducen el acceso hasta el feto desde la sangre materna. Un elemento limitante podría ser la unión del ABZSO y de la sulfona a las proteínas plasmáticas (Notarianni, 1990). El ABZSO presenta una elevada unión a las proteínas plasmáticas en las ovejas, alcanzando valores superiores al 80 % (Cristòfol y cols., 1998). Esta elevada unión a las proteínas limitaría la presencia del fármaco libre en disposición para atravesar las membranas placentarias y por tanto reduciría el acceso hasta el feto. Datos semejantes fueron observados en ovejas tras la administración de NTB. En estos estudios, el ABZSO y ABZSO₂ se encontraron en el plasma fetal y en los líquidos fetales en concentraciones cercanas a la mitad de las observadas en la sangre materna (Cristòfol y cols., 1995). La capacidad de los fármacos para atravesar las membranas placentarias en general es baja y muy variable y esta correlacionada con sus características fisicoquímicas, así la indometacina alcanza, en humanos, concentraciones fetales similares a las maternas (Moise y cols., 1990), mientras que el vigabatrin lo hace en concentraciones inferiores al 1 % (Tran y cols., 1998). Una forma de evaluar la exposición del feto al fármaco es a través de la relación

entre las AUC fetal y materna (Tonn y cols., 1995). Siguiendo este criterio, se observó que la relación de las AUC era de 0.45 para el ABZSO y de 0.33 para el ABZSO₂. Estos valores muestran que la exposición del feto al fármaco, en el cuarto mes de gestación, es inferior al 50% de la de la madre

En el presente estudio no se encontraron diferencias en los valores de MRT para el ABZSO y ABZSO₂ entre madres y fetos, indicando que la eliminación del fármaco en el feto depende de la eliminación materna. Para valorar el grado de sulfonación se han tomado las relaciones de las AUC entre ABZSO₂ y ABZSO y se ha podido observar que estas eran semejantes entre madres (0.27) y fetos (0.22), sugiriendo que el ABZSO no es metabolizado al nivel de la placenta ni en el ámbito fetal. Asimismo los perfiles cinéticos de ambas sustancias fueron paralelos durante todo el muestreo y con unas Tmax similares entre fetos y madres, indicando que las concentraciones fetales dependen de las maternas. Algunos autores (Bourget y cols., 1994; Mirkin, 1975) han sugerido la existencia de metabolismo para algunos fármacos al nivel fetal. Así, Krauer y Dayer (1991) han descrito la capacidad de los prematuros y recién nacidos de metilar la teofilina a cafeína, vía metabólica que no se da en los adultos.

Como se ha podido observar, el ABZSO pasa la membrana placentaria y alcanza el feto en concentraciones elevadas. No obstante, al poseer una estructura quiral, sus enantiómeros pueden presentar diferente capacidad de atravesar la placenta. Así, como ya se ha señalado anteriormente, en el caso de los animales no gestantes, la disposición plasmática del (+)-ABZSO en las madres presentó valores de AUC, Cmax y MRT significativamente superiores a los del (-)-ABZSO. No obstante, en el feto, los parámetros cinéticos plasmáticos de ambos enantiómeros fueron similares. Por otra parte, aunque los valores de la AUC, Cmax, y MRT del (+)-ABZSO fueron ligeramente superiores a los obtenidos para el (-)-ABZSO, estos no presentaron diferencias significativas. Estos datos sugieren la posible existencia de una capacidad diferente entre los enantiómeros para atravesar la placenta y alcanzar el feto.

Al valorar el grado de exposición del feto a los enantiómeros, se observó que la relación entre el (+)-ABZSO y (-)-ABZSO en el caso de la madre (2.8) era superior a la observada en el feto (1.6). Por otro lado, la relación de las AUC observadas en madres y fetos para el (+)-ABZSO fue de 2.5, y en el caso del (-)-ABZSO fue de 1.4. Estos resultados sugieren una permeabilidad enantioselectiva favoreciendo el paso hasta el feto del (-)-ABZSO. Otra explicación podría estar

relacionada con una diferente capacidad de unión de los enantiómeros a las proteínas plasmáticas maternas, reduciendo la concentración del fármaco libre de uno de los enantiómeros, en este caso del (+)-ABZSO. Resultados similares se han observado con el omeprazol en ovejas, donde su unión a las proteínas plasmáticas fue dos veces superior en los fetos que en las madres (Ching y cols., 1986). En el caso de los enantiómeros del ABZSO, no existen datos en la literatura de su grado de unión a las proteínas plasmáticas fetales, fenómeno que puede influenciar su distribución a los tejidos fetales, y su eliminación.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que ambos enantiómeros atraviesan la placenta y alcanzan el feto en elevadas concentraciones, lo que sugiere la necesidad de realizar estudios evaluando al paso placentario de los enantiómeros cuando éstos son administrados por separado, para comprender la capacidad independiente de cada uno de ellos de atravesar la barrera placentaria y alcanzar el feto.

Es conocido que la permeabilidad de las membranas placentarias se modifica durante la gestación, observándose significativas diferencias entre la permeabilidad a los fármacos en el primer tercio de la gestación, de aquella que aparece en la última fase de la gestación. Asimismo, hay que destacar que el período más problemático desde el punto de vista tóxico para el embrión, es el primer tercio de la gestación, cuando los tejidos se diferencian, y pueden ser dañados más fácilmente por los fármacos y/o sus metabolitos. Para poder evaluar estos procesos y teniendo en cuenta que existe una mayor facilidad para la manipulación de los animales, se realizó un estudio con ratas gestantes a las que se administró por vía oral el rac-ABZSO y en el décimo día de gestación. En este estudio se analizó cual y cuanto enantiómero (+)-ABZSO o (-)-ABZSO alcanzaba el embrión, observando posteriormente en aquellos animales en los que se desarrolló toda la gestación, que tipo de malformaciones se podrían observar en el feto y con que frecuencia estas aparecían.

Algunos son los estudios en los que, tras la administración de NTB a animales gestantes, se analizó el efecto embriotóxico y teratógeno que el ABZ y sus metabolitos eran capaces de provocar en los hijos de los animales tratados (Cristòfol y cols., 1997b; Fabre y cols., 1989; Navarro y cols. 1998; 1999). La presencia de ABZ, juntamente con ABZSO en los embriones de las ratas tratadas con NTB, no permite aclarar la responsabilidad de estas moléculas en la toxicidad embrionaria. Tanto el ABZ como el ABZSO, han demostrado en estudios *in vitro* que

poseen un elevado potencial embriotóxico. Por estas razones, el análisis de la capacidad del fármaco y de sus enantiómeros para alcanzar el embrión tras el tratamiento de hembras gestantes, puede facilitar la caracterización embriotóxica de ambos.

Después de la administración de tres dosis diferentes, por vía oral, de rac-ABZSO a ratas en el décimo día de gestación, los enantiómeros y el metabolito ABZSO₂ fueron detectados en los primeros minutos en el plasma, alcanzando concentraciones máximas entorno a las 2-3 h postadministración. Estos hechos sugieren que los procesos de absorción y de metabolismo hepático son bastante rápidos en monogástricos. Un proceso similar se observó cuando se administro ABZ a ratas (Domínguez y cols., 1995).

Las C_{max} obtenidas para el ABZSO-total y el ABZSO₂, a las dosis de 8.5 y 10 mg/kg, fueron similares entre si. Este hecho puede ser debido al estrecho margen entre ambas dosis, ya que cuando se administró una dosis de 14 mg/kg las C_{max} presentaron un aumento significativo con respecto a las restantes dosis. Aunque este incremento de la dosis no se refleja en las C_{max}, la AUC obtenida con la dosis de 10 mg/kg fue superior a la obtenida con la dosis de 8.5 mg/kg e inferior a la dosis de 14 mg/kg, en este caso la C_{max} también se vio incrementada en casi el doble de los valores observados con dosis inferiores. Estos datos sugieren que la absorción del ABZSO no es saturable en este intervalo de dosis, no obstante, puede ser que la vía metabólica responsable de la sulfonación del ABZSO a ABZSO₂ sea saturable, provocando un incremento de las concentraciones plasmáticas del sulfóxido, y consecuentemente un aumento de sus AUC. Estos resultados contrastan con los obtenidos en las ratas tratadas con NTB, donde al incrementar la dosis, las AUC del ABZSO se mantenían constantes (Cristòfol y cols., 1997b). Estos autores sugieren que este fenómeno podría ser debido a una saturación de los procesos metabólicos responsables del paso del ABZ a ABZSO, así como a la elevada velocidad de transito intestinal y a la baja capacidad reductora de los fluidos intestinales en los monogástricos para nitroreducir el NTB a ABZ.

Al analizar el perfil cinético de los enantiómeros tras la administración de las tres dosis estudiadas, se observó que el (-)-ABZSO es el que predominaba en sangre, presentando valores de C_{max} y AUC relativamente superiores al (+)-ABZSO. Este predominio del (-)-ABZSO también fue observado tras la administración oral de ABZ a ratas por Delatour y cols. (1991a). Las concentraciones plasmáticas de los enantiómeros en cada una de las tres dosis

estudiadas siguen un perfil similar sugiriendo que estos presentan procesos de eliminación no saturables en este margen de dosis administradas.

Después de 9 horas de la administración de rac-ABZSO, se sacrificaron los animales y se procedió a la recogida de los embriones para su posterior análisis según lo descrito en el apartado de materiales y métodos. En estudios *in vitro* con embriones de ratas, se observó que el ABZSO posee un efecto citotóxico a concentraciones superiores a 4,2 µg/mL (Whittaker y Faustman, 1991). En cultivos celulares, también se vio que este es capaz de inhibir la polimerización de la tubulina a concentraciones superiores a 1.95 µg/mL (Lacey y Watson, 1985) e impide el desarrollo embrionario bovino a 0.5 µg/mL (Piscopo y Smoak, 1997). Las concentraciones embrionarias del ABZSO-total observadas a las dosis de 8.5 y 10 mg/kg fueron similares a las observadas en el plasma materno, lo que sugiere que en este momento de desarrollo (10 días), la placenta de la rata, que es muy permeable, no impide de forma significativa el paso del fármaco hacia el embrión. No obstante, con la dosis de 14 mg/kg las concentraciones embrionarias fueron la mitad de las observadas en el plasma materno. Los embriones que habrían muerto presentarían bajas concentraciones. Estas bajas concentraciones de los embriones muertos prematuramente se promedian con las concentraciones de los embriones vivos, dando como resultado unas bajas concentraciones por camada como puede haber ocurrido en la dosis de 14 mg/kg. También es posible que el paso placentario sea saturable reduciendo, en parte, el acceso del fármaco al embrión.

Al analizar las concentraciones embrionarias 9 horas después del tratamiento, se observó que éstas eran inferiores a las consideradas citotóxicas, sin embargo, en este momento los embriones ya podrían haber estado expuestos a concentraciones superiores, considerando que las concentraciones maternas máximas se alcanzaron a las 2-3 h con valores superiores a 4 µg/mL en todos los tratamientos. Es conocido que la toxicidad producida por el contacto del fármaco con el embrión, puede estar relacionada tanto con los niveles de fármaco alcanzados, como con el tiempo en que el embrión está bajo el efecto del fármaco. En este caso se observó que las concentraciones plasmáticas maternas tanto para el ABZSO como para el ABZSO₂ son similares a las obtenidas en los embriones, en el caso de las dosis de 8.5 y 10 mg/kg y la mitad cuando se administró una dosis de 14 mg/kg. Estos datos sugieren, que en el momento en que en el plasma materno se alcanzaron concentraciones entre 4 y 8 µg/mL, el embrión también

habría estado sometido a niveles superiores a 2 µg/mL, concentraciones que como se ha indicado anteriormente inhiben la polimerización de la tubulina en cultivos embrionarios (Lacey y Watson, 1985). Además, el embrión puede haber estado sometido a altas concentraciones del citotóxico, en algún caso, durante más de 7 horas. La relación entre el periodo de exposición y las concentraciones alcanzadas, podrían estar relacionadas con el porcentaje, el tipo de reabsorciones y malformaciones observadas, ya que estas aumentaban con la dosis.

Después del sacrificio de las madres y la obtención de los fetos en el día 20 de gestación, en el grupo tratado con la dosis de 8.5 mg/kg, no se observaron diferencias significativas, en cuanto al número de reabsorciones, con el grupo control. No obstante, al incrementar la dosis a 10 mg/kg el porcentaje de reabsorciones aumentó significativamente. Este aumento podría estar relacionado con el tiempo durante el cual se mantuvieron las concentraciones de ABZSO elevadas. Hay que destacar que tras la administración de la dosis de 10 mg/kg, los niveles se mantienen entorno a 4 µg/mL durante más de 5 horas, por el contrario, en el caso de la dosis de 8.5 mg/kg, solo las tres horas postadministración se alcanzaron niveles de este orden. Por otra parte, las células que sobreviven a la exposición con elevadas concentraciones de fármaco, pueden presentar una división celular anormal durante el proceso de desarrollo, lo que conllevaría a la formación anormal de tejidos y órganos. Esta formación anormal puede a su vez llevar a la muerte embrionaria tardía, como se observó con la dosis de 14 mg/kg.

Al incrementar la dosis a 14 mg/kg, las muertes embrionarias alcanzaron un 100% de los embriones. De estas muertes se observó que un 80% de ellas fueron tardías, lo cual indicaría que las células de los embriones que sobrevivieron a las concentraciones tóxicas, no fueron viables en el desarrollo, poniendo en evidencia la gran capacidad embriotóxica de este fármaco. La capacidad de muchos BZD de causar muerte embrionaria, ha sido estudiada en fármacos como el triclabendazol (Yoshimura, 1987a), el flubendazol (Yoshimura, 1987b), el cambendazol (Delatour y cols., 1975) y el oxfendazol (Delatour y cols., 1977) o del pro-BZD Netobimin (Navarro y cols., 1999). Todos estos datos ponen en evidencia el riesgo que la administración de estos BZD presentan durante el desarrollo embrionario.

El análisis morfológico de fetos recogidos después del sacrificio de las madres, permitió observar malformaciones externas y esqueléticas en diferentes localizaciones. En el grupo de

ratas tratadas con la dosis de 8.5 mg/kg, el número de malformaciones encontradas no fue estadísticamente significativo en relación al grupo control. No obstante, el número de malformaciones esqueléticas presentaron un porcentaje elevado, indicando un cierto efecto teratógeno del ABZSO a dosis bajas.

En el grupo de fetos pertenecientes a madres tratadas con la dosis de 10 mg/kg rac-ABZSO, se observaron malformaciones externas graves en el 26% de los individuos. Simultáneamente en el mismo grupo se observó un incremento significativo de las malformaciones esqueléticas en un 90%. El incremento de las malformaciones esqueléticas respecto a las externas hace suponer que el fármaco afecta más al proceso de formación de los huesos que a los procesos de adquisición de la forma de la cara o del tronco. Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, aunque las concentraciones maternas y embrionarias observadas a la dosis de 8.5 y 10 mg/kg fueran semejantes, el perfil cinético y sus AUCs fueron diferentes, pudiendo ser los responsables del incremento del efecto teratógeno del fármaco. Cuando se trataron ratas con NTB, el efecto embriotóxico y teratógeno fue atribuido al ABZ y al ABZSO puesto que estas dos moléculas fueron encontradas en los embriones (Cristòfol y cols., 1997b). Los resultados de este estudio indican que el ABZSO es el principal responsable de las malformaciones encontradas en ratas tratadas con NTB, ya que el ABZ en el presente estudio no fue detectado.

Las malformaciones esqueléticas observadas se localizaban principalmente a nivel de las costillas, las vértebras y los miembros pelvianos. Al analizar la localización de las malformaciones vertebrales y costales, se vio que éstas no se localizaban en la región cervical o la torácica craneal, siendo estos datos semejantes a los observados tras la administración de NTB (Navarro y cols., 1999). Este hecho pone en evidencia una vez más que los efectos producidos por el fármaco dependen del estadio embrionario en que se realiza su administración. Por ejemplo, el tipo de malformaciones encontradas en ratas tratadas con busulfan, estaban relacionadas con el estadio (día de gestación) en que se realizaban el tratamiento de las madres gestantes (Lewin y Opitz, 1986).

En los miembros pelvianos se observaron malformaciones de la tibia y de los dedos mediales. La existencia de diferencias morfogenéticas durante el proceso de formación de los dedos se conoce desde hace años (Lewin y Opitz, 1986). Estas diferencias podrían condicionar el tipo de malformaciones óseas y su localización. Malformaciones semejantes se producen de manera

espontánea en el hombre (Rodríguez-Baeza y cols., 1997) y también se han observado en ovejas tratadas con NTB durante el primer tercio de gestación (Navarro y cols., 1998). Malformaciones similares se han detectado en ratas tras el tratamiento con flubendazol y el triclabendazol (Yoshimura, 1987a;b).

El margen de dosis en el que se ve incrementada la embriotoxicidad es bastante estrecho (8.5-10 mg/kg), si lo comparamos con tratamientos realizados con NTB (50-59 mg/kg) (Cristòfol y cols., 1997b; Navarro y cols., 1999) lo que indica la gran actividad embriotóxica de este fármaco cuando es directamente administrado a los animales.

De los resultados obtenidos con relación a los enantiómeros, se puede inferir que la presencia del (-)-ABZSO en los embriones es semejante al positivo, no obstante, la relación entre ellos con el nivel correspondiente en el plasma materno indicaría que el (-)-ABZSO pasaría algo menos que el (+)-ABZSO. Estos datos corroboran las diferencias de permeabilidad existentes entre las placentas de las ovejas y de las ratas, siendo estas últimas más permeables que las de las ovejas para este tipo de moléculas. La presencia similar de ambos isómeros no permite concluir cual de ellos puede ser el principal responsable de la toxicidad embrionaria, por lo que se requieren estudios a respecto tras su administración por separado.

3. Estudio farmacocinético de albendazol sufóxido racémico y de sus enantiómeros administrados por separado en ratas

Como se ha observado, los estudios farmacocinéticos a partir del rac-ABZSO permite evaluar algunos parámetros relativos a la disposición de ambos enantiómeros en el organismo y por tanto, evaluar su capacidad para acceder a los lugares donde se pueden localizar los parásitos y realizar su acción antihelmíntica. Asimismo estos estudios también han permitido evaluar su capacidad para acceder a los embriones y ejercer su actividad embriotóxica. No obstante, estos datos no permiten conocer la contribución de cada uno de los enantiómeros en cuanto a su actividad antihelmíntica o teratógena. Es posible que los enantiómeros de ABZSO presenten diferente actividad antihelmíntica o teratógena como ocurre con la dobutamina, donde el (+)-dobutamina es un β -agonista adrenérgico mientras que el (-)-dobutamina es un β -agonista adrenérgico (Nerurkar y cols., 1992); o con la talidomida donde el R-enantiómero no presenta

la actividad teratógena que tiene el S-enantiómero (Testa y cols., 1993).

Por otra parte, algunos enantiómeros presentan, en el organismo, inversión quiral, que puede ser uni o bidireccional, lo que hace difícil evitar las posibles reacciones adversas, que el fármaco racémico o de cualquiera de ambos enantiómeros pueden presentar. Por ejemplo, Landoni y cols. (1999) observaron, en ovejas, que había una inversión unidireccional del R(-)-ketoprofeno a S-(+)-ketoprofeno cuando estos se administraban por separado. Esta inversión, además de modificar el perfil cinético, también puede influenciar la acción farmacológica, dificultando así la identificación del enantiómero menos potente y con más efectos adversos. Como los procesos metabólicos del ABZSO son bastante complejos y además el fármaco sufre una circulación entero-plasmática, podría darse, tras la administración de cada enantiómero por separado, una inversión quiral. Un primer paso para aclarar cual es el comportamiento farmacológico de cada enantiómero es el estudio *in vivo* de su perfil cinético cuando estos son administrados por separado. Para ello se trataron ratas con 10 mg/kg de rac-ABZSO por vía oral, y con 5 mg/kg de cada uno de los enantiómeros por separado.

Después de la administración de la forma racémica, el ABZSO se detectó en el plasma poco tiempo después de su administración, alcanzando la C_{max} en menos de 1 h, lo que sugiere que la absorción del ABZSO en esta especie es bastante rápida. Estos resultados difieren de los observados en ratas gestantes donde los T_{max} se alcanzaban a las 2.5 horas. La rapidez con la que se producía la absorción en este estudio pudo ser debida al cambio de formulación ya que se utilizó una disolución en medio ácido, que facilitaba la solubilidad del ABZSO, y su incorporación a los jugos gástricos, mejorando así su disponibilidad para atravesar las membranas celulares.

Tras la administración de rac-ABZSO se observó que, en los primeros minutos, las proporciones de ambos enantiómeros se mantenían alrededor del 50%. Valores similares también fueron encontrados en ratas gestantes.

El perfil de los enantiómeros observado, difiere de lo observado en distintas especies donde el (+)-ABZSO era el enantiómero predominante (Cristòfol y cols., 2000; Delatour y cols. 1991a;b), estas diferencias podrían estar relacionadas con diferencias en la actividad de las enzimas que participan en los procesos de sulfonación. Es conocido que existen diferencias entre especies

en relación a los enzimas y vías de metabolización que intervienen en la biotransformación de los fármacos. Es posible que los enzimas del sistema Cit. P450 implicados en este proceso puedan variar entre especies, y esto implicaría las diferencias entre especies en las tasas de eliminación de ambos enantiómeros. Es por tanto, posible que la formación de la sulfona en las restantes especies estudiadas sea favorable al consumo del (-)-ABZSO, mientras que en ratas se consuma más el (+)-ABZSO.

Al administrar los enantiómeros por separado, no se observó inversión quiral. Estos resultados demuestran que la administración de un enantiómero aislado permite el estudio de su comportamiento farmacológico sin interferencia de otro enantiómero. La no presencia del racémico puede ser debida: a) a la ineficacia en ratas, de los procesos de reducción gastrointestinal de ABZSO a ABZ, que después se oxidaría a ABZSO generando ambos enantiómeros; b) la irreversibilidad de la reacción de sulfoxidación a nivel hepático, que al igual que la reducción gastrointestinal, generaría ABZ y como consecuencia ambos enantiómeros; c) la elevada estabilidad de los enantiómeros cuando se administran en separado.

El perfil cinético de los enantiómeros del ABZSO administrados por separado, es semejante al obtenido cuando se administró la forma racémica. Al igual que en la administración de la forma racémica, el (-)-ABZSO presentó concentraciones y valores de AUC mayores respecto al (+)-ABZSO. El MRT para los dos enantiómeros presenta valores semejantes. Estos resultados indican que las tasas de eliminación de los enantiómeros es similar. Además, al analizar el grado con que se forma la sulfona a través del cálculo de la relación sulfóxido/sulfona en la administración de los enantiómeros por separado, se detecta que no existen diferencias en cuanto a los valores encontrados (4.4 para (-)-ABZSO y 4.6 para (+)-ABZSO). Esta semejanza de valores sugiere que la actividad de las enzimas que participan en los procesos de sulfonación en la rata es similar tanto para el (-)-ABZSO, así como para el (+)-ABZSO. La mayor C_{max} y AUC para el (-)-ABZSO y el semejante MRT entre los enantiómeros, sugiere que la absorción es más elevada para el (-)-ABZSO, estos datos sugieren que en la rata la absorción podría ser enantioselectiva.

Hay fármacos que presentan procesos metabólicos diferenciados para cada uno de sus dos enantiómeros como es el caso de carprofeno donde el R-Carprofeno se glucuroconjugó más que el S-carprofeno (Maire-Gauthier y cols., 1998), otros como la tocaina presentan

selectividad en la eliminación renal de los enantiómeros con mayor eliminación del negativo que el positivo (Nerurkar y cols., 1992). En este estudio no fueron encontradas diferencias relacionadas a la sulfonación ya que la relación sulfóxido/sulfona es semejante para los dos enantiómeros. Sin embargo, la excreción renal y por otras vías del ABZSO, y la complejidad del esquema metabólico de este fármaco, pueden ser las responsables de que no se puedan observar posibles procesos enantioselectivos.

Los resultados obtenidos muestran que los enantiómeros de ABZSO son bastante estables, lo que permite hacer estudios relativos a eficacia y teratogenicidad de estos por separado y así poder evaluar su futura utilización en la práctica clínica. La no presencia del racémico tras la administración de los enantiómeros por separado, permite concluir que los procesos de reducción digestiva descritos por diversos autores son escasos en la rata, ya que se podrían haber observado niveles del otro enantiómero proveniente de la sulfoxidación del ABZ obtenido por reducción intestinal. Por otro lado, se ha podido ver que ambos enantiómeros presentan un perfil similar cuando son administrados en la forma racémica o por separado y que ambos son sustratos para la sulfonación. Asimismo, la reversibilidad del sulfóxido a ABZ propuesto por muchos autores (Galtier y cols., 1986; Souhaili El-Amri y cols., 1987) han resultado ser inexistente en la rata.

Conclusiones

1. Los fluidos ruminales han demostrado ser fuertemente reductores, observándose una elevada tasa de reducción del NTB y del ABZSO, indicando que es un proceso más eficiente que el de oxidación del ABZ a ABZSO y, de éste a ABZSO₂. Por lo tanto, *in vivo* debe destacarse un significativo papel de la flora bacteriana en la cinética y dinámica de estos compuestos.
2. La biotransformación de los enantiómeros, que ocurre a nivel de los fluidos ruminales, no parece ser enantioselectivo.
3. El sistema de fermentadores de doble flujo, es un modelo válido para estudiar el metabolismo ruminal de los fármacos, puesto que permite controlar todos los factores que pueden modificar el metabolismo como el pH, alimentación, condiciones anaerobias, temperatura, etc.
4. Tras la administración de rac-ABZSO a ovejas machos y hembras, el perfil cinético del ABZSO, ABZSO₂ y de los enantiómeros de ABZSO, no presentan diferencias significativas entre machos y hembras, lo cual sugiere que la eficacia antiparasitaria de este tratamiento será similar en ambos sexos, y que, el (+)-ABZSO podría ser el mayor responsable de la actividad antihelmíntica tras el tratamiento con rac-ABZSO.
5. En las ovejas se ha podido observar que el (+)-ABZSO está presente en el organismo en concentraciones más elevadas y durante más tiempo que el (-)-ABZSO, fenómeno que sugiere la existencia de unos procesos de eliminación metabólica enantioselectivos.
6. El comportamiento farmacocinético de los enantiómeros del ABZSO, en ovejas gestantes, fue semejante al observado en ovejas no gestantes, indicando que la gestación podría no afectar el perfil cinético de estos enantiómeros.
7. El perfil cinético del ABZSO y de sus metabolitos, en los fetos, fue semejante al materno, indicando que el proceso de eliminación de estos depende fundamentalmente de la depuración (metabolismo y excreción) materna.
8. Los enantiómeros del ABZSO atraviesan la barrera placentaria en la oveja, alcanzando

concentraciones cercanas a la mitad de las observadas en los mismos tiempos en el plasma materno, demostrando que la placenta es capaz de limitar el acceso del fármaco al feto.

9. En ratas, las concentraciones embrionarias de los enantiómeros del ABZSO a las dosis inferiores (8.5 y 10 mg/kg) fueron similares a las maternas sugiriendo que el paso placentario en ratas no es saturable a estas dosis. Las diferencias encontradas a la dosis de 14 mg/kg podrían ser debidas a muertes embrionarias tempranas.
10. La capacidad de ambos enantiómeros para atravesar los tejidos placentarios y alcanzar los embriones es similar, no observandose procesos que indiquen la existencia de enantioselectividad.
11. En ratas, el ABZSO causa muerte embrionaria y malformaciones congénitas en los animales tratados durante el primer tercio de gestación.
12. Tras el tratamiento con la forma racémica del ABZSO a ratas, tanto gestantes como no gestantes, el (-)-ABZSO es el enantiómero que predomina en sangre.
13. Los procesos de reducción a nivel intestinal y hepática del ABZSO en la rata no han sido detectables, indicando que la flora intestinal posee en esta especie un bajo poder reductor.
14. Cuando en ratas se administran los enantiómeros del ABZSO por separado, ambos son metabolizados a ABZSO₂, sugiriendo que ambos son buenos sustratos de los enzimas responsables de la sulfonación, y por lo tanto no se apreciaría una enantioselectividad.
15. En ratas, los enantiómeros del ABZSO, son altamente estables, no se observa inversión quiral, por lo que sería posible realizar los respectivos estudios relativos a la eficacia y la teratogenicidad de forma individual y así evaluar su posible utilización en la práctica clínica.

Bibliografía

Álvarez, L. I., Imperiale, F. A., Sánchez, S. F., Murno, G. A., Lanusse, C. E. (2000) Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology* **94**: 75-89

Álvarez, L. I., Sánchez, S. F., Lanusse, C. E. (1997) Modified plasma and abomasal disposition of albendazole in nematode-infected sheep. *Veterinary Parasitology* **69**: 241-253

Álvarez, L. I., Sánchez, S. F., Lanusse, C. E. (1999) In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **22**: 77-86

Álvarez, L. I., Saumell, C. A., Sánchez, S. F., Lanusse, C. E. (1996) Plasma disposition Kinetics of albendazole metabolites in pigs fed different diets. *Research in Veterinary Science* **60**: 151-156

Anderson, N., Martin, P. J., Jarrett, R. G. (1991a) The efficacy of mixtures of albendazole sulphoxide and levamisole against sheep nematodes resistant to benzimidazole and levamisole. *Australian Veterinary Journal* **68**: 127-132

Anderson, N., Martin, P. J., Jarrett, R. G. (1991b) Field evaluation of a mixture of albendazole sulphoxide and levamisole against *Ostertagia* and *Trichostrongylus* spp in sheep. *Australian Veterinary Journal* **68**: 133-136

Anderson, R. C., Rasmussen, M. A., Allison, M. J. (1996) Enrichment and isolation of a nitropropanol-metabolizing bacterium from the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3885-3886

Arteiza, J., Camacho-Carranza, R., Reyes-Reyes, R. E., Dorado-González, V., Espinosa-Aguirre, J. J. (2000) Induction of cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **9**: 31-37

Baggot, J. D., McKellar, Q. A. (1994) The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **17**:

409-419

Benchaoui, H. A., Scott, E. W., McKellar, Q. A. (1993) Pharmacokinetics of albendazole, albendazole sulfoxide and netobimin in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **16**: 237-240

Benoit, E., Besse, S., Delatour, P. (1992) Effect of repeated doses of albendazole on enantiomerism of its sulfoxide metabolite in goats. *American Journal of Veterinary Research* **53**: 1663-1665

Beretta, C., Fadini, L., Stracciari, J. M., Montesissa, C. (1987) In vitro febantel transformation by sheep and cattle ruminal fluids and metabolism by hepatic subcellular fractions from different animal species. *Biochemical Pharmacology* **36**: 3107-3114

Berrozpe, J. D., Lanás, J. M., Pla-Delfina, J. M. (1997) Biofarmacia y farmacocinética Biofarmacia y farmacocinética. Editorial Síntesis S.A., Madrid, pp 167-200

Boczon, K. (1976) Bioenergetics of tricinella spiralis larvae and effect of some anthelmintics on succinate deshydrogenase of Trichinella spiralis mitochondria. In: van der Bossche, H. (ed.) Biochemistry of parasites and host parasite relationships. North Holland Publishing, Amsterdam, pp 589-97

Bourget, P., Roulot, C., Fernández, H. (1994) Transfert transplacentaire et métabolisme foeto-placentaire des médicaments: méthodes d'étude, apports et implications thérapeutiques. *Thérapie* **49**: 481-497

Cabaret, J. (1991) Efficacy of netobimin against Muellerius capillaris band resistant strain of digestive tract strngyles in dairy goats. *American Journal of Veterinary Research* **52**: 1313-1315

Calsamiglia, S., Ferret, A., Plaixats, J., Devant, M. (1999) Efecto del pH y sus flutuaciones en la fermentación microbiana en cultivo continuo. *Información Tecnica Economica Agraria* **20**: 523-525

- Campbell, W. C. (1990) Benzimidazole: veterinary uses. *Parasitology Today* **6**: 130-133
- Casado, N., Pérez-Serrano, J., Denegri, G., Rodríguez-Caabeiro, F. (1996) Development of a chemotherapeutic model for the in vitro screening of drugs against *Echinococcus granulosus* cysts: the effects of an albendazole-albendazole sulphoxide combination. *International Journal for Parasitology* **26**: 59-65
- Ching, M. S., Morgan, D. J., Mihaly, G. W., Hardy, K. J., Smallwood, R. A. (1986) Placental transfer of omeprazole in maternal and fetal sheep. *Developmental Pharmacology and Therapeutics* **9**: 323-331
- Clarke, R. T. J. (1977) Protozoa in the rumen ecosystem. In: Clarke, R. T. J., Bauchop, T. (eds) *Microbial Ecology of the gut*. Academic Press, London, pp 251-275
- Cotting, J., Zeugin, T., Steiger, U., Reichen, J. (1990) Albendazole kinetics in patients with echinococcosis: delayed absorption and impaired elimination in cholestasis. *European Journal of Clinical Pharmacology* **38**: 605-608
- Cox, C. R., Faccenda, K. A., Gilhooly, C., Bannister, J., Scott, N. B., Morrison, L. M. M. (1998) Extradural S(-)-bupivacaine: comparison with racemic RS-bupivacaine. *British Journal of Anaesthesia* **80**: 289-293
- Criado-Fornelio, A., Armas-Serra, C., Jiménez-Gonzalez, A., Casado-Escribano, N., Rodríguez-Caabeiro, F. (1990) Biochemical effects of luxabendazole on *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research* **76**: 518-520
- Cristòfol, C., Carretero, A., Fernández, M., Navarro, M., Sautet, J., Ruberte, J., Arboix, M. (1995) Transplacental transport of netobimin metabolites in ewes. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **20**: 167-171
- Cristòfol, C., Franquelo, C., Navarro, M., Carretero, A., Ruberte, J., Arboix, M. (1997a) Comparative pharmacokinetics of netobimin metabolites in pregnant ewes. *Research in Veterinary Science* **62**: 117-120

Cristòfol, C., Navarro, M., Franquelo, C., J.E., V., Carretero, A., Ruberte, J., Arboix, M. (1997b) Disposition of netobimin, albendazole and its metabolites in the pregnant rat: Developmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **144**: 56-61

Cristòfol, C., Navarro, M., Franquelo, C., Valladares, J. E., Arboix, M. (1998) Sex differences in the disposition of albendazole metabolites in sheep. *Veterinary Parasitology* **78**: 223-231

Cristòfol, C., Virkel, G., Álvarez, L., Arboix, M., Lanusse, C. E. (2000) Comparative disposition of ricobendazole enantiomers after intravenous and subcutaneous administration of a racemic formulation to calves. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **21**: 303-311

Cristòfol, C., Virkel, G., Álvarez, L., Sánchez, S., Arboix, M., Lanusse, C. (2001) Albendazole sulphoxide enantiomeric ratios in plasma and target tissues after intravenous administration of ricobendazole to cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **24**: 117-124

Dannan, G. A., Guengerich, F. P., Waxman, D. J. (1986) Hormonal regulation of rat liver microsomal enzymes. Role of gonadal steroids in programming, maintenance, and suppression of steroid 5 α reductase, flavin-containing monooxygenase, and sex-specific cytochromes P-450. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 10728-10735

Deger, E., Hokelek, M., Deger, B. A., Tutar, E., Asil, M., Pakdemirli, E. (2000) A new therapeutic approach for the treatment of cystic echinococcosis: Percutaneous albendazole sulphoxide injection without reaspiration. *The American Journal of Gastroenterology* **95**: 248-254

Delatour, P., Benoit, E., Besse, S., Boukraa, A. (1991a) Comparative enantioselectivity in the sulphoxidation of albendazole in man, dogs and rats. *Xenobiotica* **21**: 217-221

Delatour, P., Benoit, E., Caude, M., Tambute, A. (1990a) Species differences in the generation of the chiral sulfoxide metabolite of albendazole in sheep and rats. *Chirality* **2**: 156-160

Delatour, P., Benoit, E., Garnier, F., Besse, S. (1990b) Chirality of the sulphoxide metabolites of fenbendazole and albendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*

13: 361-366

Delatour, P., Debroye, J., Lorgue, G., Courtot, D. (1977) Embryotoxicité expérimentale de l'oxfendazole chez le rat le mouton. *Recueil Médecine Vétérinaire* **153**: 639-645

Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., C.H., L. (1984) A correlation of toxicity of albendazole and oxfendazole with their free metabolites and bound residues. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **7**: 139-145

Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., Caude, I. (1991b) Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulphoxide in sheep, goats and cattle. *Research in Veterinary Science* **50**: 134-138

Delatour, P., Lorgue, G., Courtot, D., Lapras, M. (1975) Embryotoxicité expérimentale du cambendazole (MK 905) chez le mouton. *Bulletin of the Society of Scientific Veterinary Medicine Compendium* **77**: 197-203

Delatour, P., Parish, R. C., Gyurik, R. K. (1981) Albendazole: a comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites. *Annales de Recherche Vétérinaire* **12**: 159-167

Domínguez, L., Fagiolino, P., Gordon, S., Manta, E. (1995) Bioavailability comparison between albendazole and albendazole sulphoxide in rats and man. *IL Farmaco* **50**: 697-702

EMA. (1996) In: Albendazole sulphoxide. Summary report-Final. Committee for Veterinary Medical Products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. London

EMA (1998) Guideline on validation of analytical procedures: methodology. VICH Topic GL2. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. London

Erzurumlu, K., Hokelek, M., Baris, S., Sahin, M., Birinci, A., Amanvermez, R., Tac, K. (1998) Effect of albendazole sulfoxide solution on the scolices and the hepatobiliary system. *European*

Surgical Research **30**: 433-438

Fabre, J. M., Berthelot, X., Ferney, J. (1989) Embryotoxicite des antiparasitaires chez les ovins: observation clinique. *Revue Médecine Vétérinaire* **140**: 1089-1095

Farrier, D. S. (1997) PK Solutions (ver.2.0.2): a noncompartmental pharmacokinetic data analysis program, (Summit Research Services, Ashlanh, OH, USA)

Galtier, P. (1991) Métabolisme des benzimidazoles et activité inductrice enzymatique. *Revue Médecine Vétérinaire* **142**: 633-635

Galtier, P., Alvinerie, M., Delatour, P. (1986) In vitro sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: assay and frequency of various xenobiotics. *American Journal of Veterinary Research* **47**: 447-450

Galtier, P., Alvinerie, M., Plusquellec, Y., Tufenkji, A. E., Houin, G. (1991) Decrease in albendazole sulphonation during experimental fascioliasis in sheep. *Xenobiotica* **21**: 917-924

Gardner, M. J., Schatz, M., Cousins, L., Zeiger, R., Middleton, E., Jusko, W. J. (1987) Longitudinal effects of pregnancy on the pharmacokinetics of theophylline. *European Journal of Clinical Pharmacology* **31**: 289-295

Gottschall, D. W., Theodorides, V. J., Wang, R. (1990) The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitology Today* **6**: 118-124

Gyurik, R. J., Chow, A. W., Zaber, B., Brunner, E. L., Miller, J. A., Villani, A. J., Petka, L. A., Parish, R. C. (1981) Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats, and mice. *Drug Metabolism and Disposition* **9**: 503-508

Harris, R. Z., Benet, L. Z., Schwartz, J. B. (1995) Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs* **50**: 222-239

Hennessy, D. R. (1993) Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs in the ruminant

gastrointestinal tract. *Parasitology Today* **9**: 329-333

Hennessy, D. R., Steel, J. W., Lacey, E., Eagleson, G. K., Prichard, R. K. (1989) The disposition of albendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **12**: 421-429

Högstedt, S., Lindberg, B., Peng, D. R., Regardh, C.-G., Rane, A. (1985) Pregnancy-induced increase in metoprolol metabolism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **37**: 688-692

Hoover, W. H., Crooker, B. S. A., Sniffen, C. J. (1976) Effects of differential solid liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *Journal of Animal Science* **43**: 528-534

Horikiri, Y., Suzuki, T., Mizobe, M. (1998) Pharmacokinetics and metabolism of bisoprolol enantiomers in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **87**: 289-294

Hutt, A. J., Tan, S. C. (1996) Drug chirality and its clinical significance. *Drugs* **52** suppl: 1-12

Ingold, K., Bigler, P., Thormann, W., Cavaliero, T., Gottstein, B., Hemphill, A. (1999) Efficacies of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone against in vitro-cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1052-1061

Jiménez-González, A., Armas-Serra, C., Criado-Fornelio, A., Casado-Escribano, N., Rodríguez-Caabeiro, F., Díez, J. C. (1991) Preliminary characterization and interaction of tubulin from *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivatives. *Veterinary Parasitology* **39**: 89-99

Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., Moreno-Esparza, R. (1998) Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **50**: 43-48

Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Nagai, T., Kato, R. (1983) Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: purification, characterization, and quantification of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **225**: 758-770

Krauer, B., Dayer, P. (1991) Fetal drug metabolism and its possible clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* **21**: 70-80

Lacey, E. (1988) The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazole. *International Journal for Parasitology* **18**: 885-936

Lacey, E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today* **6**: 112-114

Lacey, E., Brady, R. L., Prichard, R. K., Watson, T. R. (1987) Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Veterinary Parasitology* **23**: 105-119

Lacey, E., Watson, T. R. (1985) Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin in vitro. *Biochemical Pharmacology* **34**: 1073-1077

Landoni, M. F., Comas, W., Mucci, N., Anglarilli, G., Bidal, D., Lees, P. (1999) Enantiospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **22**: 349-359

Landoni, M. F., Lees, P. (1996) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **19**: 466-474

Landoni, M. F., Soraci, A. L., Delatour, P., Lees, P. (1997) Enantioselective behaviour of drugs used in domestic animals. a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**: 1-16

Lanusse, C. E., Gascon, L. H., Prichard, R. K. (1993a) Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship with plasma disposition kinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **16**: 38-47

Lanusse, C. E., Gascon, L. H., Prichard, R. K. (1995) Comparative plasma disposition kinetics

- of albendazole, fenbendazole, oxfendazole and their metabolites in adult sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **18**: 196-203
- Lanusse, C. E., Nare, B., Gascon, L. H., Prichard, L. H. (1992a) Metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by ruminal and intestinal fluids of sheep and cattle. *Xenobiotica* **22**: 419-426
- Lanusse, C. E., Nare, B., Gascon, L. H., Prichard, R. K. (1992b) Bioconversion of netobimin pro-drug by gastrointestinal fluids of ruminants. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **17**: 121-128
- Lanusse, C. E., Nare, B., Prichard, R. K. (1993b) Comparative sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes and the inhibitory effect of methimazole. *Xenobiotica* **23**: 285-295
- Lanusse, C. E., Prichard, R. K. (1993) Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Veterinary Parasitology* **49**: 123-158
- Lanusse, C. E., Trudeau, S., Ranjan, S., Prichard, R. K. (1991) Pharmacokinetics profiles of netobimin metabolites after oral administration of zwitterion and trisamine formulations of netobimin to cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **14**: 101-108
- Lanusse, C. E., Virkel, G. L., Sánchez, S. F., Álvarez, L. I., Lifschitz, A. I., Imperiale, F., Monfrinotti, A. (1998) Ricobendazole kinetics and availability following subcutaneous administration of a novel injectable formulation to calves. *Research in Veterinary Science* **65**: 5-10
- Levy, R. H., Boddy, A. V. (1991) Stereoselectivity in pharmacokinetics: A general theory. *Pharmaceutical Research* **8**: 551-556
- Lewin, O. L., Opitz, J. M. (1986) Fibular a/hypoplasia: review and documentation of the fibular developmental field. *American Journal of Medical Genetics* **Suppl 2**: 215-238

Lifschitz, A., Virkel, G., Mastromarino, M., Lanusse, C. (1997) Enhanced plasma availability of the metabolites of albendazole in fasted adult sheep. *Veterinary Research Communications* **21**: 201-211

Light, D. R., Waxman, D. J., Walsh, C. (1982) Studies of the chirality of sulfoxidation catalyzed by bacterial flavoenzyme cyclohexanone monooxygenase and hog liver flavin adenine dinucleotide containing monooxygenase. *Biochemistry* **21**: 2490-2498

López-García, M. L., Torrado-Duran, S., Torrado-Duran, J., Martínez-Fernández, A. R., Bolas-Fernández, F. (1997) Albendazole versus ricobendazole (albendazole sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. *International Journal for Parasitology* **27**: 781-785

Lubega, G. W., Prichard, R. K. (1991a) Interaction of benzimidazole anthelmintics with haemonchus contortus tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Experimental Parasitology* **73**: 203-213

Lubega, G. W., Prichard, R. K. (1991b) Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin from developing stages of thiabendazole-susceptible and resistant *Haemonchus contortus*. *Biochemical Pharmacology* **41**: 93-101

Maire-Gauthier, P., Buronfosse, T., Magdalou, J., Herber, R., Besse, S., Delatour, P., Benoit, E. (1998) Species dependent enantioselective glucuronidation of carprofen. *Xenobiotica* **28**: 595-604

McCracken, R. O., Lipkowitz, K. B. (1990) Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to in vivo drug efficacy. *Journal of Parasitology* **76**: 853-864

McCracken, R. O., Stillwell, W. H. (1991) A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics. *International Journal for Parasitology* **21**: 99-104

McKellar, Q. A., Coop, R. L., Jackson, F. (1995) The pharmacokinetics of albendazole

metabolites following administration of albendazole, albendazole sulfoxide and netobimin to one-month and eight -month-old sheep. *International Journal for Parasitology* **25**: 1207-1212

McKellar, Q. A., Delatour, P., Lees, P. (1994) Stereospecific pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen in the dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **17**: 447-454

McKellar, Q. A., Jackson, F., Coop, R. L., Baggot, J. D. (1993) Plasma profiles of albendazole metabolites after administration of netobimin and albendazole in sheep: effects of parasitism and age. *British Veterinary Journal* **149**: 101-113

McKellar, Q. A., Scott, E. W. (1990) The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **13**: 223-247

Mirkin, B. L. (1975) Perinatal pharmacology: placental transfer, fetal localization, and neonatal disposition of drugs. *Anesthesiology* **43**: 156-170

Moise, K. J., Ou, C.-N., Kirshon, B., Cano, L. E., Rognerud, C., Carpenter, R. J. (1990) Placental transfer of indomethacin in the human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **162**: 549-554

Moroni, P., Buronfosse, T., Longin-Sauvageon, C., Delatour, P., Benoit, E. (1995) Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and Cytochrome P450-dependene monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **23**: 160-165

Mulder, G. J. (1986) Sex differences in drug conjugation and their consequences for drug toxicity. sulfation, glucuronidation and glutathione conjugation. *Chemical and Biological Interactions* **57**: 1-15

Navarro, M., Canut, L., Carretero, A., Cristòfol, C., Pérez-Aparicio, F. J., Arboix, M., Ruberte, J. (1999) Developmental toxicity in rat exposed to benzimidazole netobimin. *Reproductive Toxicology* **13**: 295-302

Navarro, M., Cristòfol, C., Carretero, A., Arboix, M., Ruberte, J. (1998) Anthelmintic induced congenital malformations in sheep embryos using netobimin. *Veterinary Record* **142**: 86-90

NCR. (1989) Nutrient requirements of dairy cattle. In: Press, N. A. (ed.). 6th edition edn. National Academy Press, Washington, DC.

Nerurkar, S. G., Dighe, S. V., Williams, R. L. (1992) Bioequivalence of racemic drugs. *Journal of Clinical Pharmacology* **32**: 935-943

Nomina Anatomica Veterinaria and Nomina Embryologica Veterinaria (1994). International committees on veterinary gross anatomical nomenclature. World Association of Veterinary Anatomists. Zürich and Ithaca, New York

Notarianni, L. J. (1990) Plasma protein binding of drugs in pregnancy and in neonates. *Clinical Pharmacokinetics* **18**: 20-36

Osman, A. M. M., Jacobs, D. E., Fisher, M. A., Pilkington, J. G., Jones, P. A. (1996) Effect of sub-lethal doses of albendazole on the fecundity of *Dictyocaulus viviparus*. *Research in Veterinary Science* **61**: 92-93

Ottesen, E. A., Ismael, M. M., Horton, J. (1999) The role of albendazole in programmes to eliminate lymphatic filariasis. *Parasitology Today* **15**: 382-386

Oxberry, M. E., Reynoldson, J. A., Thompson, R. C. A. (2000) The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **23**: 113-120

Pérez, R., Espinoza, M., Riquelme, R., Parer, J. T., Llanos, A. J. (1989) Arginine vasopressin mediates cardiovascular responses to hypoxemia in fetal sheep. *American Journal of Physiology* **256**: R1011-R1018

Pérez-Serrano, J., Casado, N., Denegri, G., Rodríguez-Caabeiro, F. (1994) The effects of

albendazole and albendazole sulphoxide combination-therapy on *Echinococcus granulosus* in vitro. *International Journal for Parasitology* **24**: 219-224

Pérez-Serrano, J., Denegri, G., Casado, N., Bodega, G., Rodríguez-Caabeiro, F. (1995) Anti-tubulin immunohistochemistry study of *Echinococcus granulosus* protoscolices incubated with albendazole and albendazole sulphoxide in vitro. *Parasitology Research* **81**: 438-440

Pérez-Serrano, J., Denegri, G., Casado, N., Rodríguez-Caabeiro, F. (1997) In vivo effect of oral albendazole and albendazole sulphoxide on development of secondary echinococcosis in mice. *International Journal for Parasitology* **27**: 1341-1345

Piscopo, S. E., Smoak, I. W. (1997) Comparison of effects of albendazole sulfoxide on in vitro produced bovine embryos and rat embryos. *American Journal of Veterinary Research* **58**: 1038-1042

Rahman, M. S., Bryant, C. (1977) Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: effects of cambendazole and mebendazole. *International Journal for Parasitology* **7**: 403-9

Rawden, H. C., Kokwaro, G. O., Ward, S. A., Edwards, G. (2000) Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology* **49**: 313-322

Redondo, P. A., Álvarez, A. I., García, J. L., Larrode, O. M., Merino, G., Prieto, J. G. (1999) Presystemic metabolism of albendazole: experimental evidence of an efflux process of albendazole sulfoxide to intestinal rumen. *Drug Metabolism and Disposition* **27**: 736-740

Reuter, S., Jensen, B., Buttenschoen, K., Kratzer, W., Kern, P. (2000) Benzimidazoles in the treatment of alveolar echinococcosis: a comparative study and review of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 451-456

Richards, L. S., Zimmerman, G. L., Nelson, M. J., Schons, D. J., Dawley, S. W. (1987) The anthelmintic efficacy of netobimin against experimental infections of *fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology* **26**: 71-77

Ridoux, O., Drancourt, M. (1998) In vitro susceptibilities of the microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, and *Encephalitozoon intestinalis* to albendazole and its sulfoxide and sulfone metabolites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**: 3301-3303

Rodríguez-Baeza, A., Minguella, J., Soldado, F., Ortega, M., Escolà, J. (1997) Congenital tibial aplasia with preaxial polydactyly. *Acta Anatomica* **160**: 51-61

Rowland, I. R. (1986) Reduction by the gut microflora of animals and man. *Biochemical Pharmacology* **35**: 27-32

Sánchez, S., Álvarez, L., Pis, A., Quiroga, M., Lanusse, C. (1999) Differences in plasma and abomasal kinetics of albendazole and its metabolites in calves grazed on pasture or fed a grain-based diet. *Research in Veterinary Science* **66**: 223-230

Sánchez, S., Álvarez, L. I., Lanusse, C. E. (1996) Nutritional condition affects the disposition kinetics of albendazole in cattle. *Xenobiotica* **26**: 307-320

Sánchez, S., Álvarez, L. I., Lanusse, C. E. (1997) Fasting-induced changes to the pharmacokinetics behaviour of albendazole and its metabolites in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**: 38-47

Sanyal, P. K., Knox, M. R., Singh, D. K., Hennessy, D. R., Steel, J. W. (1995) Influence of diet type on the kinetic disposition of fenbendazole in cattle and buffalo. *International Journal for Parasitology* **25**: 1201-1205

Singh, D., Sanyal, P. K., Swarnkar, C. P., Khan, F. A., Bhagwan, P. S. K. (1999) Influence of diet type and pretreatment fasting on the disposition kinetics of albendazole in sheep. *Veterinary Research Communications* **23**: 229-240

Solana, H. D., Rodríguez, J. A., Lanusse, C. E. (2001) Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitology Research* **87**: 275-280

Solana, H. D., Sallovitz, J. M., Najle, R., Rodríguez, J. A., Lanusse, C. E. (2000) Liver sulphoxidative metabolism of albendazole in rat: enantioselectivity and effect of methimazole. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* **22**: 83-88

Soraci, A., Benoit, E., Jaussaud, P., Lees, P., Delatour, P. (1995) Enantioselective glucuronidation and subsequent biliary excretion of carprofen in horses. *American Journal of Veterinary Research* **56**: 358-361

Sotelo, J., Jung, H. (1998) Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clinical Pharmacokinetics* **34**: 503-515

Souhaili El-Amri, H., Fargetton, X., Delatour, P., Batt, A. M. (1987) Sulfoxidation of albendazole by FAD-containing and cytochrome P-450 dependent monooxygenases from pig liver microsomes. *Xenobiotica* **17**: 1159-1168

Souhaili El-Amri, H., Mothe, O., Totis, M., Masson, C., Batt, A. M., Delatour, P., Siest, G. (1988) Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome P-450c. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **246**: 758-764

Staples, R. E., Schnell, V. L. (1964) Refinements in rapid clearing technic in the KOH-Alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technology* **39**: 61-63

Steel, J. W., Hennessy, D. R. (1999) Influence of ruminal bypass on the pharmacokinetics and efficacy of benzimidazole anthelmintics in sheep. *International Journal for Parasitology* **29**: 305-314

Swarnkar, C. P., Sanyal, P. K., Singh, D., Khan, F. A., Bhagwan, P. S. K. (1998) Comparative disposition kinetics of albendazole in sheep following oral and intraruminal administration. *Veterinary Research Communications* **22**: 545-551

Takahashi, H., Kashima, T., Nomizo, Y., Muramoto, N., Shimizu, T., Nasu, K., Kubota, T., Kimura, S., Echizen, H. (1998) Metabolism of warfarin enantiomers in Japanese patients with heart disease having different CYP2C9 and CYP2C19 genotypes. *Clinical Pharmacology and*

Therapeutics **63**: 519-528

Taylor, P. M., Delatour, P., Landoni, F. M., Deal, C., Pickett, C., Shojaee Aliabadi, F., Foot, R., Lees, P. (1996) Pharmacodynamics and enantioselective pharmacokinetics of carprofen in the cat. *Research in Veterinary Science* **60**: 144-151

Tejada, P., Sánchez-Moreno, M., Monteoliva, M., Gómez-Banqueri, H. (1987) Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole anthelmintics. *Veterinary Parasitology* **24**: 269-274

Testa, B., Carrup, P. A., Gal, J. (1993) The so-called interconversion of stereoisomeric drugs: an attempt at clarification. *Chirality* **5**: 105-111

Tonn, G. R., Doroudian, A., Gordon, J. G., Rurak, D. W., Riggs, K. W., Abbott, F. S., Axelson, J. E. (1995) New approaches for drug and kinetic analysis in the maternal-fetal unit. *NIDA Research Monography* **154**: 175-202

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

Tran, A., O'Mahoney, T., Rey, E., Mumford, J. P., Olive, G. (1998) Vigabatrin: placental transfer in vivo and excretion into breast milk of the enantiomers. *British Journal of Clinical Pharmacology* **45**: 409-411

Venkatesan, P. (1998) Albendazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**: 145-147

Villaverde, C., Álvarez, A. I., Del Estal, J. L., Prieto, J. G. (1992) Albendazole and mebendazole uptake by isolated enterocytes. *Developmental Pharmacology and Therapeutics* **19**: 27-31

Villaverde, C., Álvarez, A. I., Redondo, P., Voces, J., Del Estal, J. L., Prieto, J. G. (1995) Small intestinal sulphoxidation of albendazole. *Xenobiotica* **25**: 433-441

Virkel, G., Lifschitz, A., Pis, A., Lanusse, C. (1999) Influence of diet on the pattern of

gastrointestinal biotransformation of netobimin and albendazole sulphoxide in sheep. *European Journal of Drug metabolism and Pharmacokinetics* **24**: 31-37

Virkel, G., Lifschitz, A., Soraci, A., Sansinanea, A., Lanusse, C. (2000) Enantioselective liver microsomal sulphoxidation of albendazole in cattle: effect of nutritional status. *Xenobiotica* **30**: 381-393

Walshe, J. M. (1992) Chirality of penicillamine. *Lancet* **339**: 254

Waxman, D. J., Dannan, G. A., Guengerich, F. P. (1985) Regulation of rat hepatic cytochrome P450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry* **24**: 4409-4417

Waxman, D. J., Light, D. R., Walsh, C. (1982) Chiral sulfoxidations catalyzed by rat liver cytochromes P-450. *Biochemistry* **21**: 2499-2507

Weller, R. A., Pillgrim, A. F. (1974) Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of a sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *British Journal of Nutrition* **32**: 341-351

White, P. F., Ham, J., Way, W. L., Trevor, A. J. (1980) Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients. *Anesthesiology* **52**: 231-239

Whittaker, S. G., Faustman, E. M. (1991) Effects of albendazole and albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **109**: 73-84

Williams, K., Lee, E. (1985) Importance of drug enantiomers in clinical pharmacology. *Drugs* **30**: 333-354

Williams, K. M. (1989) Chirality: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in 3 dimensions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **16**: 465-470

Witkamp, R. F., Nijmeijer, S. M., Mennes, W. C., Rozema, A. W., Noordhoek, J., Van-Miert, A. S. (1983) Regioselective O-demethylation of scoparone (6,7-methoxycoumarin) to assess cytochrome P450 activities in vitro in the rat. Effect of gonadal steroids and the involvement of constitutive P450 enzymes. *Xenobiotica* **23**: 401-410

Yokoyama, M. T., Johnson, K. A. (1988) Microbiology of the rumen and intestine. In: Church, D. C. (ed.) the ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Prentice Hall, New Jersey, pp 125-144

Yoshimura, H. (1987a) Teratogenic evaluation of triclabendazole in rats. *Toxicology* **43**: 283-287

Yoshimura, H. (1987b) Teratogenicity of flubendazole in rats. *Toxicology* **43**: 133-138