

1925

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA.

Presidencia: Sr. Dr. \_\_\_\_\_

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. ANTONIO RAMON MARTINEZ FERNANDEZ

Vocal: Sr. Dr. ANGEL DE VILLAR DEL PIESO

Vocal: Sr. Dr. CRISTINA DE ARMAS SERCA

Vocal: Sr. Dr. JULIO PELETO FERNANDEZ

Secretario: Sr. Dr. LEON LOPEZ TORRADO DURAN

POTENCIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DEL ALBENDAZOL  
MEDIANTE MODIFICACIONES EN SU BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO

Memoria presentada para optar a  
la obtención del Grado de Doctor  
por:

M<sup>a</sup> LUZ LOPEZ GARCIA.

Director:  
Prof. Dr. D. FRANCISCO BOLAS

MADRID, 1996

D. ANTONIO R. MARTINEZ FERNANDEZ, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: Que la licenciada en Farmacia, M<sup>a</sup> Luz López García, Ha realizado bajo la dirección del Prof. Dr. D. Francisco Bolás Fernández, la memoria titulada: " POTENCIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DEL ALBENDAZOL MEDIANTE MODIFICACIONES EN SU BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO", para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid, a 27 de Mayo de 1996



FACULTAD DE FARMACIA  
DPTO. DE PARASITOLOGIA

*Antonio R. Martínez*

A mis Padres  
A Goyo

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas gracias a las cuales se ha podido realizar esta tesis doctoral:

Al Prof. Dr. D. Francisco Bolás Fernández, cuya dirección y estímulo han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Catedrático del Dp<sup>o</sup>. de Parasitología no sólo por permitirme trabajar en el departamento a su cargo sino también por sus consejos y dedicación .

A la Prof<sup>a</sup> Dra. D<sup>a</sup> Mercedes Martínez Grueiro, por su directa participación en la ejecución de los planteamientos experimentales llevados a cabo, y en quien siempre encontré la ayuda y apoyo que necesité.

Al Prof. Dr. D José Luis Guillén Llera, así como a M<sup>a</sup> Dolores Sardaña Ripoll y todos los compañeros de cuarto, que siempre estuvieron dispuestos a prestarme su ayuda.

A todo el Dep. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por su constante colaboración, especialmente a los profesores D. Juan José Torrado Durán y D. Santiago Torrado Durán, y por supuesto a Dña Susana Torrado Durán cuya memoria versa sobre el estudio farmacéutico de nuevas formulaciones del albendazol presentada en 1994.

A los Lab<sup>o</sup> Smitkline Beechan Pharmaceuticals, de forma especial a Dña Pilar Coronel y a los Lab<sup>o</sup> Chemo Ibérica, por las muestras de albendazol recibidas.

Por último y no menos importante mi agradecimiento a todos los profesores y compañeros del Departamento de Parasitología, por el ánimo y ayuda que me han prestado

A todos, por todo, MUCHAS GRACIAS.

MATERIAS.	PAGS
1. INTRODUCCION . . . . .	9
2. REVISION BIBLIOGRAFICA. . . . .	17
2.1. <i>Trichinella</i> /RATÓN, COMO MODELO EXPERIMENTAL DE QUIMIOTERAPIA ANTIHELMÍNTICA. . . . .	19
2.1.1 Ciclo biológico de <i>Trichinella</i> spp. . . . .	19
2.1.1.1 Fase entérica . . . . .	20
2.1.1.2 Fase migratoria. . . . .	21
2.1.1.3 Fase parenteral. . . . .	22
2.1.2 Quimioterapia experimental de la trichinellosis murina. . . . .	23
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS FÁRMACOS ENSAYADOS, BENZIMIDAZOLES. . . . .	33
2.2.1 Síntesis de benzimidazoles . . . . .	33
2.2.2 Mecanismo de acción de benzimidazoles . . . . .	39
2.2.3 Farmacocinética de benzimidazoles: albendazol (ABZ) . . . . .	43
2.2.3.1 Administración, absorción y distribución . . . . .	43
2.2.3.2 Metabolismo y excreción. . . . .	46
2.2.3.2.1 Consideraciones sobre el metabolismo del albendazol . . . . .	48
2.2.3.2.2. Quiralidad en la molécula de albendazol-sulfóxido.(ABZSO)	53
2.2.3.2.3 Efecto de inhibidores enzimáticos en el metabolismo de albendazol. . . . .	54
2.3 UTILIDADES VETERINARIAS DEL ALBENDAZOL. . . . .	61
2.3.1 Nuevos sistemas de administración. . . . .	61
2.3.2 Eficacia de nuevas formulaciones de albendazol. . . . .	63
2.4 ALBENDAZOL EN LA QUIMIOTERAPEUTICA HUMANA. . . . .	75
3. MATERIAL UTILIZADO. . . . .	85
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN . . . . .	87
3.2 PARÁSITO: CEPA DE <i>Trichinella</i> . . . . .	87

---

<b>3.3 FÁRMACOS ENSAYADOS</b> .....	88
<b>3.3.1</b> Fármacos de referencia .....	88
<b>3.3.2</b> Nuevas formulaciones .....	88
<b>3.3.3</b> Inhibidores metabólicos .....	89
<b>3.3.4</b> Otros. ....	89
<b>4. TECNICAS UTILIZADAS.</b> .....	91
<b>4.1 METODOS ANALITICOS DEL ALBENDAZOL.</b> .....	91
<b>4.1.1 HPLC</b> .....	91
<b>4.1.1.1</b> Análisis de materia prima. ....	91
<b>4.1.1.2</b> Métodos de determinación de ABZ y ABZSO en muestras biológicas. ....	93
<b>4.1.2</b> Difracción de rayos X. ....	93
<b>4.1.3</b> Calorimetría diferencial de barrido. ....	96
<b>4.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES DE ALBENDAZOL.</b> .....	98
<b>4.2.1</b> Soluciones líquidas. ....	98
<b>4.2.2</b> Dispersiones sólidas. ....	99
<b>4.3 MÉTODO DE ESTUDIO BIOFARMACEÚTICO Y FARMACOCINÉTICO</b> ..	100
<b>4.3.1</b> . De las formulaciones seleccionadas. ....	100
<b>4.3.1.1</b> Animales de experimentación .....	100
<b>4.3.1.2</b> Fármacos y dosis utilizadas .....	100
<b>4.3.1.3</b> Obtención de muestras sanguíneas .....	101
<b>4.3.1.4</b> Determinación de las concentraciones plasmáticas de ABZSO por HPLC. ....	101
<b>4.3.2</b> Del albendazol administrado junto con inhibidores microsomales hepáticos. ....	106
<b>4.3.2.1</b> Animales de experimentación .....	106
<b>4.3.2.2</b> Fármacos y dosis administrados. ....	106
<b>4.3.2.3</b> Recogida de muestras sanguíneas y análisis por HPLC. ....	107

<b>4.4 TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS.</b> . . . . .	108
<b>4.4.1</b> Dosis infestante . . . . .	108
<b>4.4.2</b> Infestación con larvas obtenidas previa digestión de las canales. . . . .	108
<b>4.4.3</b> Aplicación de los fármacos . . . . .	109
<b>4.4.4</b> Digestión de la canal y recuento de larvas. . . . .	110
<b>4.4.5</b> Recuperación de adultos y recuento. . . . .	111
<b>4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> . . . . .	112
<b>4.5.1</b> De las pruebas biofarmacéuticas y farmacocinéticas. . . . .	112
<b>4.5.2</b> De las pruebas farmacológicas. . . . .	112
<b>5. EXPERIENCIAS REALIZADAS</b> . . . . .	113
<b>5.1 ALBENDAZOL COMO MATERIA PRIMA</b> . . . . .	115
<b>5.1.1</b> Introducción . . . . .	115
<b>5.1.2</b> Experiencias sobre la fase o estado de preadultos . . . . .	117
<b>5.1.3</b> Experiencias sobre la fase de asentamiento muscular . . . . .	117
<b>5.1.4</b> Experiencias sobre la fase muscular . . . . .	118
<b>5.1.5</b> Estudio biofarmacéutico y farmacocinético . . . . .	118
<b>5.2 RICOBENDAZOL (ALBENDAZOL-SULFÓXIDO)</b> . . . . .	119
<b>5.2.1</b> Bioequivalencia . . . . .	119
<b>5.2.1.1</b> Experiencias sobre la fase o estado de adultos. . . . .	119
<b>5.2.2</b> Actividad antiparasitaria . . . . .	120
<b>5.2.2.1</b> Sobre el estado de preadultos. . . . .	120
<b>5.2.2.2</b> Sobre la fase migratoria. . . . .	120
<b>5.2.2.3</b> Sobre la fase muscular. . . . .	121
<b>5.2.3</b> Estudio biofarmacéutico y farmacocinético. . . . .	122
<b>5.3 POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA,         MEDIANTE FORMULACIONES DE SOLUBILIDAD EXALTADA.</b> . . . . .	123

5.3.1	Introducción . . . . .	123
5.3.2	Experiencias sobre preadultos . . . . .	125
5.3.3	Experiencias sobre la fase de asentamiento muscular . . . . .	127
5.3.4	Experiencias sobre la fase muscular. . . . .	128
5.3.5	Estudio biofarmacéutico y farmacocinético . . . . .	128
5.4	<b>PÓSIBLE POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DEL ALBENDAZOL POR INHIBIDORES DE OXIDASAS MICROSOMALES.</b> . . . . .	129
5.4.1	Introducción . . . . .	129
5.4.2	Pruebas farmacológicas para determinar la dosis óptima en la relación fármaco/inhibidor. . . . .	131
5.4.2.1	Experiencias manteniendo fija la dosis de albendazol y variando la del inhibidor. . . . .	131
5.4.2.2	Experiencias variando la dosis del albendazol y manteniendo fija la del inhibidor. . . . .	133
5.4.3	Estudio de los parámetros biofarmacéuticos y farmacocinéticos. . . . .	134
5.4.3.1	Estudio de la modificación de las concentraciones plasmáticas de ABZSO, tras la administración de inhibidores microsomales, dosis única (t = 0 horas). . . . .	134
5.4.3.2	Estudio de la modificación de las concentraciones plasmática de ABZSO, tras la administración de inhibidores en los tiempos 0, 24 y 48 horas. . . . .	135
5.4.4	Prueba comparativa respecto a la actividad antihelmíntica de dosis únicas/dosis repetidas. . . . .	136
5.4.4.1	Efecto de la asociación ABZ/MTZ . . . . .	136
5.4.4.2	Efecto de la asociación ABZ/MTP . . . . .	136
5.5	<b>POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DEL ALBENDAZOL HACIENDO USO DE DOS RECURSOS FARMACOTÉCNICOS.</b> . . . .	137
5.5.1	Efecto de la asociación SLGEN/MTZ y MTP sobre larvas emigrantes de <i>T. spiralis</i> . . . . .	137
5.5.2	Efecto de la asociación SLGEN/MTZ y MTP sobre larvas enquistadas de <i>T. spiralis</i> . . . . .	137

<b>6 RESULTADOS.</b> . . . . .	139
<b>6.1. ALBENDAZOL COMO MATERIA PRIMA.</b> . . . . .	141
<b>6.1.1 Actividad antiparasitaria</b> . . . . .	141
<b>6.1.1.1 Fase de preadultos.</b> . . . . .	141
<b>6.1.1.2 Fase migratoria.</b> . . . . .	144
<b>6.1.1.3 Fase muscular</b> . . . . .	148
<b>6.2 RICOBENDAZOL (ALBENDAZOL SULFÓXIDO)</b> . . . . .	153
<b>6.2.1 Experiencias sobre adultos: Bioequivalencia</b> . . . . .	153
<b>6.2.2 Actividad antiparasitaria</b> . . . . .	154
<b>6.2.2.1 Fase de preadultos</b> . . . . .	154
<b>6.2.2.2 Fase de asentamiento muscular</b> . . . . .	157
<b>6.2.2.3 Sobre larvas enquistadas</b> . . . . .	160
<b>6.2.3 Estudio biofarmacéutico y farmacocinético del ricobendazol.</b> . . . . .	163
<b>6.3 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE LAS NUEVAS FORMULACIONES DESARROLLADAS.</b> . . . . .	165
<b>6.3.1 Sobre el estado de preadultos</b> . . . . .	165
<b>6.3.1.1 Eficacia de la dispersión sólida y solución líquida de GEN-ABZ</b> . . . . .	165
<b>6.3.1.2 Eficacia de la dispersión sólida y solución líquida de SKF-ABZ</b> . . . . .	170
<b>6.3.1.3 Eficacia de la solución líquida y dispersión sólida de RBZ</b> . . . . .	174
<b>6.3.2 Sobre la fase de asentamiento muscular.</b> . . . . .	178
<b>6.3.2.1 Eficacia de GEN-ABZ formulado como solución y dispersión</b> . . . . .	178
<b>6.3.2.2 Eficacia de SKF-ABZ formulado como dispersión y solución</b> . . . . .	182
<b>6.3.2.3 Eficacia de RBZ formulado como solución y dispersión.</b> . . . . .	186
<b>6.3.3 Sobre la fase muscular.</b> . . . . .	190
<b>6.3.3.1 Eficacia de GEN-ABZ y sus formulaciones</b> . . . . .	190
<b>6.3.3.2 Eficacia de las formulaciones de SKF-ABZ</b> . . . . .	195
<b>6.3.3.3 Eficacia de RBZ formulado como dispersión y solución</b> . . . . .	199
<b>6.4 POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DEL ALBENDAZOL POR INHIBIDORES DE OXIDASAS MICROSOMALES.</b> . . . . .	203
<b>6.4.1 Actividad antiparasitaria de los inhibidores utilizados.</b> . . . . .	203
<b>6.4.1.1 En la fase migratoria.</b> . . . . .	203

6.4.1.2 En la fase muscular. . . . .	204
6.4.2 Pruebas farmacológicas para determinar la relación óptima fármaco/ inhibidor . . . . .	205
6.4.2.1 Experiencias realizadas manteniendo fija la dosis de albendazol y variando la del inhibidor . . . . .	205
6.4.2.1.1 Sobre la fase migratoria. . . . .	205
6.4.2.1.2 Sobre la fase de larvas enquistadas. . . . .	207
6.4.2.2 Experiencias realizadas manteniendo fija la dosis de inhibidor y variando la del albendazol. . . . .	209
6.4.2.2.1 Sobre la fase migratoria. . . . .	209
6.4.2.2.2 Sobre la fase muscular . . . . .	213
6.4.3 Estudio de los parámetros biofarmacéuticos y farmacocinéticos. . . . .	216
6.4.3.1 Modificación de las concentraciones plasmáticas, tras la administración de ABZ mas inhibidores microsomaes (t=0 horas). . . . .	217
6.4.3.1.1 Efecto del MTP sobre el metabolismo del albendazol . . . . .	217
6.4.3.1.2 Efecto del MTZ sobre el metabolismo del albendazol . . . . .	219
6.4.3.2 Modificación de las concentraciones plasmáticas de ABZSO, tras la administración de ABZ más inhibidores microsomaes (t= 0, 24 y 48 horas). . . . .	222
6.4.4 Actividad antihelmíntica del albendazol, tras la coadministración de dosis únicas fármaco/inhibidor. . . . .	229
6.4.4.1 Efecto de la asociación GEN*-ABZ/MTZ y GEN*-ABZ/MTP. . . . .	229
6.4.4.1.1 Sobre larvas migratorias. . . . .	229
6.4.4.1.2 Sobre larvas enquistadas. . . . .	234
6.5 POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DEL ALBENDAZOL MEDIANTE EL USO DE DOS RECURSOS FARMACOTÉCNICOS. . . . .	238
6.5.1 Efecto de la asociación SIGEN-ABZ/MTP y SIGEN-ABZ/MTZ sobre larvas migratorias de <i>T.spiralls</i> . . . . .	238
6.5.2 Efecto de la asociación SIGEN-ABZ/MTZ y SIGEN-ABZ/MTP sobre larvas enquistadas de <i>T.spiralls</i> . . . . .	239

<b>7 . DISCUSION</b> .....	241
<b>7.1 <i>T.spiralis</i> COMO MODELO PARA LA EVALUACIÓN DE ALBENDAZOLES GENÉRICOS.</b> .....	243
<b>7.2 ALBENDAZOL VERSUS RICOBENDAZOL EN LA QUIMIOTERAPIA DE <i>T.spiralis</i>.</b> .....	247
<b>7.3 EFICACIA ANTIPARASITARIA DE LAS NUEVAS FORMULACIONES GALÉNICAS DE ALBENDAZOL Y RICOBENDAZOL.</b> .....	255
<b>7.3.1 Soluciones líquidas</b> .....	255
<b>7.3.1.1 Toxicidad aguda</b> .....	255
<b>7.3.1.2 Evaluación de la eficacia antihelmíntica</b> .....	256
<b>7.3.2 Dispersiones sólidas</b> .....	261
<b>7.3.2.1 Evaluación de la actividad antihelmíntica</b> .....	262
<b>7.4 COADMINISTRACIÓN DE ALBENDAZOL E INHIBIDORES MICROSOMALES</b> .....	265
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	273
<b>9. BIBLIOGRAFIA.</b> .....	277

# **INTRODUCCION**

## 1. INTRODUCCION

El desarrollo de nuevos antiparasitarios, para su uso tanto en medicina humana como veterinaria, requiere un enfoque multidisciplinar; recurriendo a la tecnología farmacéutica se producen o mejoran sustancias dotadas de una posible actividad farmacológica, hecho que se comprueba, haciendo uso de modelos experimentales para el cribado farmacológico tanto "*in vivo*" como "*in vitro*".

Estos modelos experimentales deben responder a un planteamiento económico simple, es decir, deben permitir obtener los máximos rendimientos, utilizando los mínimos medios posibles.

Por lo tanto, deberán mantenerse en medios u hospedadores baratos, utilizar técnicas de análisis sencillas y los resultados obtenidos se deben caracterizar por su universalidad, pudiendo ser extrapolables a otros modelos reales.

En este sentido, un modelo que nos permite realizar un cribado sencillo y eficaz, es el nematodo Trichinella en el ratón, ya por su fácil mantenimiento en estos animales de laboratorio, si bien, por el corto período de tiempo necesario para reproducir su ciclo biológico completo, además de las características del mismo, pues presenta la peculiaridad de contar sucesivamente una fase intestinal, sanguínea y tisular, con lo cual, en un mismo modelo y en un corto período de tiempo, podemos ensayar fármacos con una posible actividad antihelmíntica extrapolable a un gran número de estados clínicos reales.

En los últimos años han surgido nuevos fármacos antiparasitarios que actúan esencialmente sobre helmintos. Dentro de estos se encuentra el grupo de los benzimidazoles y derivados, si bien el tiabendazol no es un medicamento nuevo, se le ha incluido por similitud con otros benzimidazoles nuevos y por ser el fármaco de elección en ciertas parasitosis, como larva migratoria visceral y

cutánea, estrongiloidosis generalizada y tricostrongiloidosis (Campell y col., 1986, Cook 1990, Beus, 1989). Otro de los benzimidazoles muy utilizado es el mebendazol, que presenta mayor tolerancia que el tiabendazol, así, es el fármaco de elección en helmintiasis tales como: - ascariosis, oxiyuriasis, tricocefalosis. Sin embargo, después del advenimiento del albendazol, el mebendazol pasó a ser el fármaco alternativo, siendo desplazado por este último (Cook 1990, Edwards y col. 1988). Considerado actualmente el albendazol como el derivado benzimidazólico más común, presenta mejor absorción que el mebendazol y flubendazol y escasos o nulos efectos colaterales, por lo que ha reemplazado también a éste, en la terapia antihelmíntica, convirtiéndose en fármaco de elección en el tratamiento de la ascariosis y oxiyuriasis, así como en la profilaxis y tratamiento de la hidatitosis (Horton, 1989). En la actualidad está reemplazando al praziquantel como fármaco de primera línea en el tratamiento de la neurocisticercosis, sobre todo, en aquellos casos en los cuales éste último resulta ineficaz (Sotelo 1988) y se ha considerado como fármaco promesa en infecciones oportunistas por microsporidios, en enfermos con SIDA (Haque 1993, Dieterich 1994, Weber 1993 y Curry 1993,). Por último, debemos mencionar que, en la fase intestinal de la triquinosis, se ha utilizado albendazol en forma precoz, cuando se sospecha la infestación en personas cercanas al núcleo de infestación, e incluso en los casos clínicos cuando se diagnostican precozmente (Fouestie y col. 1988). También se ha demostrado en algunos estudios que, tras el tratamiento de la triquinosis con albendazol, la serología se negativiza antes y el número de quistes residuales es menor que cuando el tratamiento se realiza con otros fármacos (Fourestie y col., 1988).

El antihelmíntico ideal debe poseer una serie de características, entre las cuales podemos incluir: - amplio espectro de acción ( eficaz frente a todos los helmintos intestinales y sistémicos, tanto en estado adulto como larvario); 100% de eficacia cuando se administra en una dosis única., posibilidad de administración a niños y mujeres embarazadas; estable en condiciones ambientales normales, y además su coste, debe ser el mínimo posible (Cook 1990). Hasta que este fármaco se desarrolle, agentes como tetracloroetileno, sales de piperazina, levamisol, pamoato de pirantel, entre otros, seguirán siendo utilizados.

Una molécula que cumple casi en su totalidad estas características puede ser el albendazol, sin embargo y en contrapartida, éste presenta un inconveniente que

comparte con otras moléculas de su grupo y es su escasa solubilidad, y por lo tanto una absorción también escasa, lo que hace que sea muy eficaz en parasitosis intestinales, donde una baja absorción expone al parásito a altas concentraciones del fármaco durante tiempos prolongados. Por el contrario, las parasitosis extraintestinales no son tan vulnerables por no alcanzar el albendazol la concentración adecuada en la biofase, interaccionar con el parásito y ejercer su acción; lo que contribuye a una disminución en los niveles de eficacia. A este punto también se le puede unir la posible existencia de formas cristalinas inactivas, descritas para otros benzimidazoles.

El hecho de que el mayor problema que presenta el albendazol sea su baja solubilidad, hace de este fármaco un candidato idóneo para el desarrollo de nuevas formulaciones de solubilidad exaltada, tanto en velocidad como en magnitud.

Numerosos estudios farmacocinéticos realizados en diversas especies animales, incluyendo humanos, han descrito unas concentraciones plasmáticas de albendazol casi inapreciables ( $< 0,01 \mu\text{g/ml}$ ), debido a su paso previo por el hígado, causa por la cual muestra esta baja biodisponibilidad, lo que afecta negativamente a su actividad frente a parásitos extraintestinales).

Por otro lado, también es bien conocido el metabolismo de esta sustancia en el cual la vía oxidativa es la ruta principal, con la formación sucesiva de sulfóxido (ABZSO), dotado también de actividad farmacológica, y sulfona (ABZSO<sub>2</sub>) (Lanusse y col., 1993). Estudios " *in vitro* " con netobimin (precursor de albendazol) han demostrado que el metabolismo del albendazol tiene lugar en la fracción microsomal hepática, siendo una flavín-monooxigenasa (FMO) la responsable de la sulfoxidación, mientras que la sulfonación, mas lenta e irreversible, correría a cargo del sistema citocromo P-450. Así la administración de inhibidores de oxidases microsomales incrementa significativamente la concentración de ABZ y ABZSO en el plasma de ovejas y terneros, pudiendo ello traducirse en un incremento notable de la actividad antiparasitaria.

Fouts y Brodie en 1955, demostraron que la inhibición de enzimas presentes en la fracción microsomal hepática constituía el mayor factor en la actividad sinérgica

del SKF 525-A, cuando se administraba junto a otros fármacos, aunque este inhibidor ya había sido utilizado anteriormente para potenciar la actividad de otras sustancias como el hexobarbital (Cook, L y col.. 1954), o para aumentar la actividad analgésica, pero no la depresión respiratoria de la morfina (Cook L y col 1954), entre otros.

El hecho de que el albendazol se esté utilizando cada vez con mayor frecuencia en diversas infecciones e infestaciones parasitarias, junto con el hecho de poseer unas características tanto farmacodinámicas como farmacotécnicas idóneas para el desarrollo de nuevas formulaciones, además de para el estudio de sustancias que ejercieran un efecto sinérgico, fue el motivo por el cual este grupo de investigación decidió realizar dos tesis doctorales complementarias: por un lado el *estudio farmacéutico de nuevas formulaciones galénicas de albendazol* realizado en el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica por D<sup>a</sup> Susana Torrado Durán (1994), y por otro, el estudio de la *actividad antihelmíntica de nuevas formulaciones de este fármaco y el efecto sinérgico de inhibidores del metabolismo microsomal, en distintas fases del ciclo biológico de T. spiralis*, motivo de esta tesis.

**OBJETIVOS:** En la presente tesis doctoral se han fijado los siguientes objetivos principales, dirigidos hacia una potenciación de la actividad antihelmíntica del bencimidazol carbamato, ALBENDAZOL:

1. Caracterización de dos moléculas de albendazol (bioequivalentes) suministradas por dos casa comerciales distintas.
2. Comparación de la actividad antiparasitaria de los dos productos anteriores, con la de su metabolito activo ricobendazol ( albendazol-sulfóxido).
3. Aplicación de nuevas formulaciones galénicas como posibles potenciadores de la eficacia antiparasitaria de albendazol y ricobendazol.
4. Evaluación del posible efecto sinérgico de inhibidores de enzimas microsomas hepáticos, en su administración conjunta con albendazol.

**PLANTEAMIENTO:** Dividimos el trabajo en 6 fases:

1. Valoración de la actividad antihelmíntica de dos moléculas de albendazol bioequivalentes.
2. Valoración de la actividad antihelmíntica de distintas formulaciones galénicas de ambos albendazoles, seleccionadas por su mayor solubilidad, para ensayos farmacológicos "*in vivo*".
3. Estudio comparativo de la actividad antiparasitaria del albendazol, ricobendazol y de las nuevas formulaciones obtenidas de ambos.
4. Estudio comparativo de la posible potenciación de la actividad antihelmíntica del albendazol, mediante modulación de su farmacocinética, por inhibidores de oxidasas microsomas.

5. Determinación de las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas de distintas formulaciones del albendazol, así como de la administración conjunta albendazol/inhibidor microsomal (siguiendo distintas pautas de dosificación), mediante la técnica de HPLC, tras su administración oral a ratones.

6. Uso de estos dos recursos, en una misma experiencia, como posible potenciación de la actividad antiparasitaria. Pruebas biológicas "*in vivo*" en el modelo T. spiralis/ratón.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la colaboración del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de esta Facultad; en el cual se han planificado y llevado a cabo los estudios de caracterización y elaboración de las formulaciones del albendazol y ricobendazol, lo que constituye parte de una línea conjunta de trabajo de ambos Departamentos.

## **REVISION BIBLIOGRAFICA**



## 2.1. *Trichinella* / RATON, COMO MODELO EXPERIMENTAL DE QUIMIOTERAPIA ANTIHELMINTICA.

### 2.1.1 CICLO BIOLÓGICO DE *Trichinella* spp.

El ciclo biológico de *Trichinella* spp. se caracteriza porque el mismo hospedador actúa como hospedador definitivo, en una de las fases del ciclo que tiene lugar a nivel intestinal, con el paso de las formas larvarias hasta adultos y la reproducción sexual de éstos, y como hospedador intermediario en una segunda fase, de ubicación muscular, con el asentamiento de estas formas larvarias y su posterior evolución hasta el estado infestante para un nuevo hospedador. Este tipo de ciclo recibe el nombre de "autoheteroxeno".

Tanto en la fase enteral como en la parenteral, el parásito induce cambios estructurales y químicos significativos. La larva infestante ( $L_1$ ) ubicada en el tejido muscular estriado, en unas estructuras altamente organizadas, produce una gran modificación en las células musculares (Purkerson y Despommier, 1974). La vida de esta  $L_1$  en estado "de espera" puede ser tan larga como la vida del hospedador.

En contraste, los gusanos adultos se sitúan en las células del epitelio columnar o epitelio simple cilíndrico de la mucosa intestinal, tanto en células caliciformes como enterocitos o células absortivas, sobre todo en la base de las vellosidades, encontrándose directamente en el citoplasma, no apareciendo rodeadas de membrana del hospedador (Gardiner, 1976; Wright, 1979).

Esta fase intestinal es transitoria, permaneciendo desde varias semanas a meses, dependiendo de la capacidad de la respuesta inmunitaria de cada cepa, dentro de especies distintas de hospedadores (Wakelin y Denham, 1983; Bell, 1985). Así, cuando *T. spiralis* parasita a ratones desnudos (Ruitenbergh, 1977) las formas adultas permanecen en el intestino durante toda la vida del hospedador.

Los nuevos embriones constituyen la fase no intracelular y existen principalmente como formas libres, dentro del lumen de vasos sanguíneos y linfáticos. Sin embargo, estos embriones en su comportamiento, tienden a infestar células del músculo esquelético y a menudo penetran en células en las cuales no llegan a formar quistes como, cerebro, corazón, riñón, entre otros.

#### 2.1.1.1 Fase entérica.

La transmisión del parásito de un individuo a otro se realiza casi exclusivamente por la ingestión del tejido muscular infestado con larvas (L<sub>1</sub>) enquistadas. Aunque se han descrito otras vías de infestación, menos importantes.

Normalmente cuando un hospedador susceptible (Despommier, 1983) ingiere tejido muscular infestado por Trichinella, se produce un proceso de digestión por acción de la pepsina y del ácido clorhídrico del estómago, proceso que dura unos minutos, durante el cual la larva no sufre ningún desarrollo.

Una vez liberada, la L<sub>1</sub> rápidamente penetra en la mucosa intestinal, produciéndose una modificación en estas células para constituir el alojamiento de las larvas, por lo que a este nicho se le denomina "intramulticelular" (Despommier, 1983; Capo y col., 1984).

Aunque se han citado varias localizaciones que pueden servir como nicho intramulticelular, es generalmente el duodeno donde se localizan el mayor número de larvas.

Una vez en su nicho intramulticelular, las L<sub>1</sub> sufren cuatro mudas, que se completan en un espacio de 30 horas, alcanzando el estado juvenil. Una vez llegados a la madurez sexual se produce rápidamente el apareamiento, presumiblemente dentro de la mucosa intestinal (Despommier, 1983)

Los machos no son expulsados inmediatamente después de la cópula; sino que persisten en el intestino durante un período mas o menos largo (Podhajecy,

1964; Thomas, 1965; Martínez Fernández, 1978; Sanmartín Durán, 1979; Despommier, 1983). No obstante, parece que los machos son los primeros en ser expulsados, así, la autocuración y sus comienzos pueden comprobarse por la permanencia de la meseta intestinal de adultos y análisis de la relación sexual.

Una vez fecundadas las hembras, en el interior de los huevos, se desarrollan las L<sub>1</sub>, eclosionan en el interior del útero y posteriormente son eliminados por la vulva. Esta larviposición se realiza en el epitelio, desde donde las larvas migran a vénulas y vasos linfáticos.

### 2.1.1.2 Fase migratoria.

El comienzo de la fase migratoria depende de la especie hospedadora. Una vez que las L<sub>1</sub> abandonan el útero de las hembras, son transportadas rápida y pasivamente a los músculos, las larvas atraviesan la lámina propia intestinal, alcanzan los vasos linfáticos, vía vena cava superior llegan al corazón y por la aorta se incorporan a la sangre arterial para ser distribuidas por todo el organismo. El pico de aparición de L<sub>1</sub> en sangre oscila entre el 9<sup>o</sup> día p.i (Harley y Gallichico, 1971) y el día 12<sup>o</sup> p.i (Yang y col., 1984).

La fase de emigración es el único período, junto con el breve tiempo en el cual las L<sub>1</sub> permanecen en el estómago tras la infestación, en el cual Trichinella se comporta como un parásito extracelular.

A pesar de que se han descrito infestaciones transitorias en células de diversos órganos, únicamente las células del tejido muscular estriado constituyen el nicho intracelular adecuado para que continúe el desarrollo de la larva, a partir de este momento Trichinella se convierte en un parásito intracelular.

Existen numerosos trabajos sobre los músculos más frecuentemente infestados, de los cuales se concluye que los músculos que tienen mayor actividad son los más altamente parasitados (diafragma, maseteros, intercostales, bíceps, tríceps, flexores y extensores de carpo y tarso, linguales, faríngeos etc.).

### 2.1.1.3 Fase parenteral.

Durante esta primera fase intracelular, las larvas aparecen asociadas al citoplasma de la célula hospedadora (Despommier, 1975). Durante la pausa que se produce en su ciclo de desarrollo (días 3º y 4º postpenetración) el nicho intracelular muestra una nueva disposición, produciéndose cambios estructurales de forma que la célula hospedadora pierde las características de fibra muscular y adquiere las características de "célula nodriza" (Backwinkle y Themann, 1972; Despommier, 1975).

El crecimiento de la larva dentro de su nicho es, sobre todo debido al crecimiento de su esticosoma (Despommier, 1973; Bruce, 1974). El gusano enrollado en el interior de su célula nodriza, alcanza así la situación "de espera", antes de reiniciar una nueva fase entérica en otro hospedador.

El tiempo necesario para la calcificación de los quistes varía considerablemente en función de la especie hospedadora; en general se admite que las larvas permanecen viables durante largos períodos de tiempo en el interior de los quistes calcificados; así Weatherly, 1983, hace un estudio en el cual compara los tiempos que tarda el quiste en calcificarse según el hospedador al cual parasita, encontrando que la rata es la especie que menos tarda en formar y completar el quiste (ya que a los 2 meses los quistes pueden estar calcificados); a continuación figura el conejo, que comienza su formación a los tres meses, viéndola cumplimentada a los siete; para el cerdo son 9 meses; hombre y ratón 18 y 29 meses respectivamente, estos resultados coinciden con los expuestos por Gould, 1970.

### 2.1.2 QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL DE LA TRIQUINELLOSIS MURINA.

El problema de las infestaciones producidas por helmintos, es muy amplio y de gran importancia tanto en la práctica médica como veterinaria, de modo tal, que representan el grupo más importante de infecciones del planeta, con implicación de helmintos de muy diversas especies.

Se han desarrollado distintas estrategias para combatir estas infecciones; tanto utilizando métodos preventivos como paliativos. Con el descubrimiento del tiabendazol se abrieron las puertas del desarrollo e investigación de todo un grupo químico y terapéutico: Los benzimidazoles.

En la práctica clínica, albendazol, flubendazol, y mebendazol son los benzimidazoles mas utilizados. Estos mostraron ser muy eficaces en parasitosis intestinales, sin embargo su limitada absorción y rápido metabolismo hace que solo administrados a altas dosis y durante largos períodos de tiempo muestren eficacia sobre parásitos sistémicos y tisulares.

Dado el gran índice de infestaciones provocadas por parásitos tisulares, y su difícil quimioterapia, se han realizado numerosos estudios utilizando modelos experimentales, tanto "*in vivo*" como "*in vitro*", encaminados al descubrimiento de nuevos fármacos y mejora de las moléculas ya existentes, intentando en lo posible reducir costes.

Nosotros nos hemos centrado en un modelo experimental sencillo para la selección de productos con posible actividad antihelmíntica, por la facilidad de su mantenimiento y métodos de experimentación; a sí como por las características de su ciclo biológico, ya que podemos establecer una relación entre los efectos de un fármaco a nivel intestinal, sistémico y tisular. Por lo que, en esta revisión nos limitaremos al efecto de distintos antihelmínticos en el modelo experimental T. spiralis / rata-ratón.

Ante el elevado número de trabajos publicados sobre la eficacia de los distintos compuestos utilizados frente a T. spiralis, hemos elegido, al objeto de no extendernos demasiado en esta revisión, un sistema tabular que recoge, desde los años 80, los trabajos mas representativos sobre el tema (tabla 1).

Se han realizado numerosos ensayos para conocer la relación estructura-actividad del núcleo benzimidazólico sobre la fase muscular de T. spiralis. Gharizanova y col., 1972, encuentran que varios benzimidazoles sustituidos en posición 2, eran menos activos que tiabendazol y demostraron que si este sustituyente era un radical aril, en orto; la actividad aumentaba. Aboult-Atta y Denham, 1978, indican que el compuesto 5-benzimidazol, tiabendazol, era mas eficaz contra larvas enquistadas que sobre la fase muscular en desarrollo. De un estudio sobre la relación estructura actividad, entre varios benzimidazol carbamatos sustituidos en posición 2 y 5, Ozeretskovskaja y col., 1971; Kolosova y col., 1976; Bekisk y col., 1979, concluyeron que la mayor actividad la tenían los 2- aril ó 2-alquil carbamatos, y entre los primeros, los orto-sustituidos; siendo el sustituyente en orto un halógeno o un heteroátomo en el anillo; entre los alquil benzimidazol-2-carbamatos. La mayor eficacia se encontró con el metil carbamato, disminuyendo la misma a medida que la cadena alquílica es mas larga.

En cuanto a la actividad comparada de los benzimidazol sustituidos en 5, Spaldova y Corba, 1979, observan que la sustitución del carbono (mabendazol, flubendazol) unido al radical cíclico en 5 por un azufre (fenbendazol, oxfendazol), resulta en una disminución o pérdida completa de actividad sobre larvas musculares, mientras que si el azufre se introduce en una cadena alifática (albendazol) se mantiene la eficacia, la cual se pierde cuando se sustituye el azufre por un oxígeno (oxibendazol); así concluyen que fenbendazol(excepto a dosis altas), oxibendazol y oxfendazol solo son activos sobre la fase intestinal de T. spiralis, mientras que parbendazol, mebendazol, cambendazol y albendazol lo son sobre ambas fases, intestinal y tisular.

**Tabla 1 - Eficacia de los antihelmínticos benzimidazólicos sobre T.spiralis. (dosis orales en mg/kg, salvo indicación).**

Autor(es) y año	Compuesto	Dosis	Período o fase tratamiento	Eficacia o efecto	Hospedador
Martinez, 1979	mebendazol	50/40	35-37 días p.i	71/78 %	ratón
		30/20/10	35-37 días p.i	61/72/72 %	ratón
		5/3	35-37 días p.i	100% l.muertas	
	oxfendazol	700/500	35-37 días p.i	48,6/26 %	ratón
		400/300/200	35-37 días p.i	22/29 %	ratón
	Fenbendazol	300/200/100	35-37 días p.i	25/12/7 %	ratón
oxibendazol	40/30/20	35-37 días p.i	59/50/35 %	ratón	
Burak, 1980	tiabendazol	100	90 días p.i	69/58/40 %	ratón
	mebendazol	100	90 días p.i	54 %	rata
Karunakaran y Denham, 1980	oxfendazol	1,6	7 horas p.i	61 %	rata
		7x50	Larvas enquistadas	99 %	ratón
	oxibendazol	3200	72 horas p.i	98 %	ratón
		200	larvas enquistadas	69 %	ratón
McCraken y Taylor, 1980	mebendazol	3,125	14-16 días p.i	82 %	ratón
		6,25	14-16 días p.i	90 %	ratón
		12,5	14-16 días p.i	90 %	ratón
		3,125	28-30 días p.i	86 %	ratón
		6,25	28-30 días p.i	92 %	ratón
		12,5	28-30 días p.i	84 %	ratón

Tabla 1 - continuación..

Autor(es) y año	Compuesto	Dosis	Período o fase tratamiento	Eficacia o efecto	Hospedador
Bolás-Fernandez y col, 1981	oxfendazol	5/7/15	24 horas p.i	55/92/100	ratón
	febantel	10/25/50	24 horas p.i	40/45/45	ratón
	tioxidazol	10/25/50	24 horas p.i	14/47/63	ratón
	oxfendazol	25/50	6 día p.i	52/36	ratón
		100/200	6 día p.i	59/85	ratón
	febantel	50 /100	6 día p.i	15/25	ratón
		200/ 300	6 día p.i	40/43	ratón
	tioxidazol	20/40/50	6 día p.i	50/57/51	ratón
	oxfendazol	300/400/500	13-15 días p.i	45/70/88	ratón
	tioxidazol	100/200/300	13-15 días p.i	2 / 3 /9	ratón
	febantel	100	13-15 días p.i	34	ratón
	oxfendazol	200/300/400	35-37 días p.i	89/91/97	ratón
	tioxidazol	50/100/200	35-37 días p.i	9/13/16	ratón
	febantel	100	35-37 días p.i	34	ratón
Dlugiewicz-Bulla y col., 1981	fenbendazol	50	27-33 días p.i	66 %	ratón
	cambendazol	50	27-33 días p.i	95 %	ratón
Duwel, 1981	fenbendazol	100 ppm	6-36 horas p.i	100 %	ratón
		dieta			
		100 ppm	5-9 días p.i	100 %	ratón
		500 ppm	10-14 días p.i	100 %	ratón
	500 ppm	35-39 días p.i	82,7 %	ratón	
Pereverzeva y col., 1981	fenbendazol	75	2-4 días p.i	elevada	ratón
	parbendazol	75	6-11 días p.i	elevada	ratón
			25-30 días p.i	escasa	ratón

Tabla 1 - continuación...

Autor(es) y año	Compuesto	Dosis	Período o fase tratamiento	Eficacia o efecto	Hospedador
Spaldonová, 1981 continuación	febantel	15/50	24 horas p.i	43/49 %	ratón
		100/200	24 horas p.i	99,9 %	ratón
	fenbendazol	15/50	24 horas p.i	21/93 %	ratón
		100/200	24 horas p.i	96/94 %	ratón
	febantel	15	48 horas p.i	49 %	ratón
	fenbendazol	15	48 horas p.i	23 %	ratón
	fenbendazol	100	3-6 días p.i	93 %	ratón
			6-8 días p.i	68,7 %	ratón
			8-11 días p.i	39,8 %	ratón
			28-31 días p.i	31,8 %	ratón
			30-33 días p.i	33 %	ratón
			3-6 días p.i	86 %	ratón
	febantel	100	6-8 días p.i	79 %	ratón
			8-11 días p.i	12,1 %	ratón
			28-31 días p.i	73,7 %	ratón
30-33 días p.i			81,6 %	ratón	
6-8 días p.i			83,8 %	ratón	
fenbendazol	200	30-33 días p.i	54 %	ratón	
		6-8 días p.i	82,5 %	ratón	
febantel	200	6-8 días p.i	82,5 %	ratón	
		30-33 días p.i	98,6 %	ratón	
Abia-Vega y col., 1982	albendazol	100	38- 40 días p.i	60 %	ratón
McCraken y col. 1982	mebendazol	7,5	3-6 días p.i	93 %	ratón
		b.i.d 150	3-6 días p.i	62 %	ratón

Tabla 1 . continuación...

Autor(s) y año	Compuesto	Dosis	Período o fase tratamiento	Eficacia o efecto	Hospedador	
Maki y Yanagisawa, 1983	flubendazol	10/50/100	28-33 días p.i	99/100/64	ratón	
Alcaino y col 1984	tiabendazol	500	5 días p.i	96,4 %	ratón	
			13-15 días p.i	83,3 %	ratón	
			60-62 días p.i	42,2 %	ratón	
McCrahen y col., 1984	oxfendazol	2x50	72 horas p.i	73 %	ratón	
			2x12,5	3-7 días p.i	85 %	ratón
			2x12,5	14-17 días p.i	92 %	ratón
			2x12,5	28-31 días p.i	99 %	ratón
He, W y col., 1986	albendazol	50	7 días p.i	86,19 %	rata	
			75x2	15 días p.i	95,17 %	rata
			50x3	40 días p.i	74,31 %	rata
	mebendazol	150x3	15 días p.i	80,92 %	rata	
			200x3	40 días p.i	90,35 %	rata
	tiabendazol	750	15 día pi	65,89 %	rata	
	oxibendazol	50x3	40 días p.i	96,36 %	rata	
	albendazol	300ppm	7-14 días p.i	91,23 %	rata	
	oxfendazol	300 ppm	7-14 días p.i	99,43 %	rata	
	Boulos.L.M y col.,1987	albendazol	0,05 mg (vial 20mg/ml)	2 horas a.i	100 %	ratón albino
24 horas p.i				1,6 %	ratón albino	
48 horas p.i				29,5 %	ratón albino	
72 horas p.i				60,3 %	ratón albino.	
0,05 mg x3				1ª semana p.i	40	ratón albino
2ª semana p.i				-	ratón albino	

Tabla 1. continuación...

Autor(es) y año	Compuesto	Dosis	Período o fase tratamiento	Eficacia o efecto	Hospedador
Boulos.LM, 1987 continuación	albendazol	0,05 X3	3ª semana p.i	10	ratón albino
			4ª semana p.i	38,1	ratón albino
			5ª semana p.i	60	ratón albino
			6ª semana p.i	41,4	ratón albino
			7ª semana p.i	40	ratón albino
			8ª semana p.i	32,52	ratón albino
Grzywinski, y col.,1988	luxabendazol	20	5-9 días p.i	100 %	ratón
			10-14 días p.i	98,9 %	ratón
			35-39 días p.i	99,9 %	ratón
Keittivuti,A y Keittivuiti,B 1989	mebendazol	50x3	2-4 día p.i	99,7 %	ratón
			10-12 día p.i	76,21 %	ratón
			21-23 días p.i	97,91 %	ratón
			28-30 días p.i	96,73 %	ratón
	albendazol	50x3	2-4 días p.i	99,95 %	ratón
			10-12 días p.i	36,22 %	ratón
			21-23 días p.i	50,59 %	ratón
			28-30 días p.i	63,76 %	ratón
	dietil- carbamicina	50x3	2-4 días p.i	ineficaz	ratón
			10-12 días p.i	72,85 %	ratón
			21-23 días p.i	16,05 %	ratón
			28-30 días p.i	ineficaz	ratón
McCraken, R.O y col., 1989	isómero de oxibendazol	100 12,5-400	3 días p.i	ineficaz	ratón
			preadultos	ineficaz	ratón

Tabla 1 . continuación...

Autor(es) y año	Compuesto	Dosis	Período o fase tratamiento	Eficacia o efecto	Hospedador
Baltar.P y col.,1989	netobimin	20	todas las dosis	17 %	ratón
		40	fuero adminis-	65/3/2/9 %	ratón
		60	tradas los días	67/6/8/17	ratón
	netobimin	100	1 p.i / 6 p.i /	-/6/9/30 %	ratón
		300	13,14,15 p.i /	86/3/37/75	ratón
		500	35,36,37 p.i.	90/8/48/84	ratón
Hckova.G y col.,1993	albendazol	10x3	muscular	5 %	ratón
	liposomas	i,p			
		10x6i,p	muscular	38 %	ratón

p.i= postinfestación, i.p = intraperitoneal, i.m = intramuscular, b.i.d = dos veces al día.  
a.i = antes de la infestación.

Posteriormente Latif-La y Surin, 1993, utilizaron este modelo experimental en la fase preadultos y adultos para el cribado comparado de 8 benzimidazol carbamatos: - mebendazol, flubendazol, oxibendazol, oxfendazol, albendazol, 7090163 proflubendazol, 708118 " cianido " benzimidazol y 78012 " selenio " benzimidazol, administrados oralmente a ratones. Compuestos con el sustituyente en posición 5 portador de un átomo de carbono, azufre, oxígeno, resultaron mas potentes que aquellos cuyo sustituyente era selenio o un grupo CN, además su eficacia era mayor en la fase enteral que en gusanos adultos. Estos mismos autores resaltaron la importancia de este modelo para el desarrollo de nuevos derivados benzimidazólicos, con una posible actividad frente a parásitos tisulares como pueden ser las filarias.

Todos los autores que han estudiado el efecto triquinelicida de los benzimidazoles sobre la fase intestinal, coinciden en señalar que a medida que los vermes maduran en el intestino, su susceptibilidad al tratamiento se ve disminuida. Existen un número de factores, extensibles a otros helmintos, que pueden influir en la respuesta al tratamiento de la fase entérica: mudas, variación en la localización de los vermes con respecto a la mucosa o diferencias bioquímicas básicas en el metabolismo energético entre los estados larvario y adulto, (Campbell,1967). Así, los vermes inmaduros que utilizan vías fermentativas casi exclusivamente deben ser particularmente vulnerables a la acción quimioterapéutica de aquellos antihelmínticos que inhiben el sistema de la fumarato reductasa y sus reacciones asociadas a la fosforilación oxidativa (McCracken, 1978).

En la quimioterapéutica se utilizan numerosos compuestos que si bien, deben su actividad a un modo de acción principal, muchos autores comparten el hecho de que ésta, se debe a un conjunto de múltiples modos de acción, que afectan a diferentes actividades celulares. *T.spiralis*, ha sido utilizado como modelo experimental, para determinar el modo de acción de benzimidazoles y derivados, bien a nivel citoesquelético (Jiménez-González. A y col.,1991), bien por su acción a nivel microsomal, por inhibición de algún sistema enzimático (Rodríguez-Caabeiro.F y col.,1985; Criado Fornelio.F y col.,1987).

A fin de determinar el papel que ejercen las distintas barreras de protección de los parásitos tisulares, como puede ser membranas, quistes etc.. y el sistema inmunitario del hospedador, en la respuesta a la terapia con antihelmínticos; se puede utilizar el modelo *T.spiralis* /hospedador, en la fase muscular. Han sido numerosos los estudios realizados para determinar el papel de la cápsula quística en la respuesta a antihelmínticos. Tras la administración de albendazol a ratones infestados con *T.spiralis*, el proceso destructivo comienza en la pared quística, seguido por la invasión de células inflamatorias en el interior de la cápsula quística (aprox 14 días p.i), siendo éste el intervalo durante el cual se ha observado un daño mayor en la terapia con albendazol. Sin embargo, aproximadamente en el día 35 p.i, se observa una alta resistencia al tratamiento antihelmíntico, sin que se haya evidenciado ninguna respuesta inmunológica del tejido del hospedador hacia el parásito. La administración de albendazol produce cambios en el carácter e intensi-

dad de las reacciones inflamatorias de las células. Esto sugiere que la acción del fármaco en producir una lesión en el parásito es primaria, precediendo a la actividad de células inflamatorias (.Hreckova, 1993). Una similar interpretación del modo de acción para oxfendazol ha sido descrita por Gutiérrez-Palomino, 1988). Así mismo, el efecto del mebendazol sobre larvas enquistadas de *T.spiralis* se produce como consecuencia de una colaboración del antihelmíntico y la defensa inmunitaria del hospedador( Sanmartín Duran y col.,1980; Martínez Fernandez y col.,1982).

Por último, destacar que la presencia de parásitos, puede modificar las condiciones del hospedador al cual parasita, produciéndose en consecuencia, una modificación en la farmacocinética del medicamento, que puede tanto potenciar sus efectos secundarios, como hacerlo ineficaz. Dada la importancia de la monitorización de los fármacos en un hospedador, se han realizados estudios del comportamiento de benzimidazoles y derivados en el modelo *T.spiralis* /ratón, para establecer la influencia que ejercen los distintos cambios estructurales que sufren las células del hospedador, en la evolución de los distintos benzimidazoles (Velebný, 1992a, 1992b); así cambios producidos en el pH intestinal influyen en la absorción y excreción de fármacos; los procesos inflamatorios afectan a la constante de eliminación y aclaramiento; por último, cambios en la estructura del músculo estriado modifica la distribución de estos fármacos.

## **2.2. CARACTERISTICAS DE LOS FARMACOS ENSAYADOS; BENZIMIDAZOLES.**

Los bencimidazoles fueron introducidos dentro del mercado de salud animal principalmente para el control de nematodos gastrointestinales, sin embargo su uso se generalizó rápidamente al encontrar grandes ventajas frente a la terapia convencional, en términos de aumentar el espectro de acción (eficaces contra estados inmaduros) y ser poco tóxicos para el hospedador animal.

En las pasadas dos décadas se ha conseguido un gran desarrollo en la quimioterapia antihelmíntica aplicada a la medicina clínica. Mientras el prazicuantel ha sido considerado de primera línea en infestaciones por cestodos y nematodos, Gordon Cook (1990), explica como la introducción de los benzimidazoles: - tiabendazol, mebendazol y recientemente albendazol - han causado un gran impacto de seguridad y efectividad en las infestaciones por nematodos intestinales y sistémicos, así como en infestaciones por cestodos.

Los modernos benzimidazoles incluyen varios compuestos que son "profármacos", que siendo administrados en forma de no benzimidazoles, dentro del organismo tratado son metabolizados a benzimidazoles dotados de actividad antihelmíntica.

### **2.2.1. SINTESIS DE BENZIMIDAZOLES.**

Una base que hizo interesarse en el anillo benzimidazólico como núcleo a partir del cual desarrollar agentes quimioterápicos con una posible actividad antihelmíntica, fue en 1950 cuando se encontró que 5,6-dimetil-1-(alfa-D-ribofuranosil) benzimidazol formaba parte integral de la vitamina B<sub>12</sub>. Meticulosos y numerosos estudios

demonstraron su efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades producidas por parásitos.

A partir del descubrimiento del tiabendazol en 1961, por modificación en su estructura, se sintetizaron miles de compuestos benzimidazólicos, de los cuales solo han tenido importancia comercial aproximadamente unos 20.

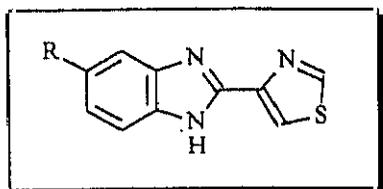
Benzimidazol, como su nombre indica, es un sistema bicíclico, formado por condensación de un benceno en posición - 4 - y - 5 - de un heterociclo (imidazol).

Compuestos benzimidazólicos y bencilcarbamatos son materias cristalinas, los cuales pueden poseer características ácidas, básicas o ambas según presenten o no sustituciones en los átomos de N del anillo imidazol.

Las modificaciones realizadas en el anillo benzimidazólico ( **Figura 1** Townsend y col., 1990) mostraron que los compuestos procedentes de la sustitución 2 y 5 fueron los más activo antihelmínticamente.

La síntesis de los benzimidazoles se produce fundamentalmente en dos pasos (**Figura 2**, Townsend y col., 1990): - Se obtiene el anillo benceno con los dos grupos amino y con el radical de sustitución que se haya elegido, después se cierra el anillo del derivado 1,2 diaminobenceno para formar el anillo del imidazol. Este puede ser el final de la síntesis, aunque ésta también puede continuar con adición de otros sustituyentes exocíclicos.

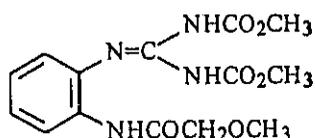
**BENZIMIDAZOLES**



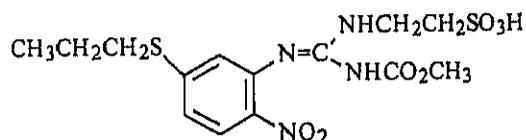
R = H **Tiabendazol**

R = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOCONH **Cambendazol**

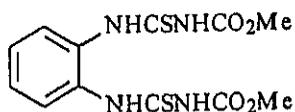
**PROFARMACOS**



**Febantel**

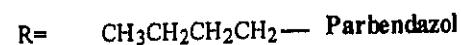
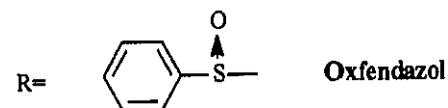
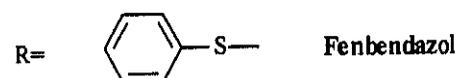
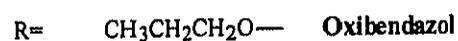
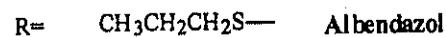
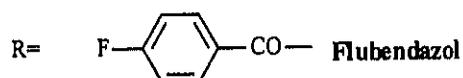
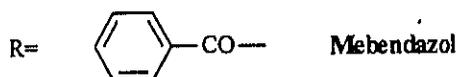
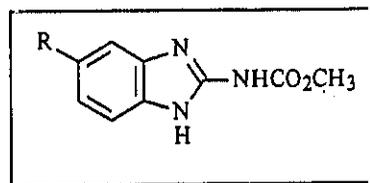


**Netobimin**



**Tiofanato (metil)**

**CARBAMATOS DE BENZIMIDAZOL**



**Figura 1.** Modificaciones en el anillo del benzimidazol. Tipos de benzimidazoles.

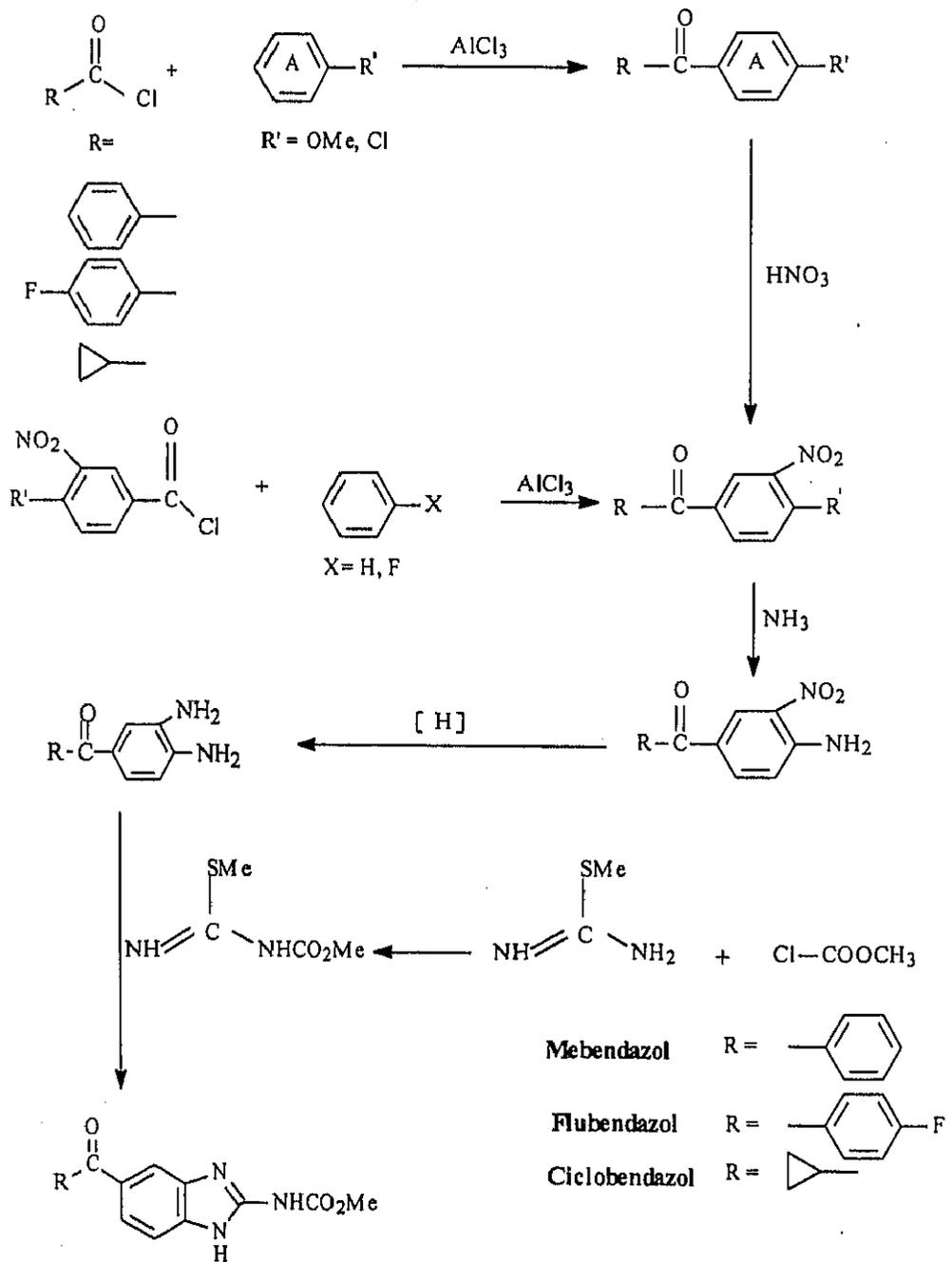


Figura 2. Síntesis de benzimidazoles

Un grupo de investigadores de MERCK sintetizaron una primera generación de benzimidazoles que incluía tiabendazol y los 2-fenil derivados, mostrando una alta actividad. Sin embargo, la formación de metabolitos inactivos tras la hidroxilación enzimática en la posición 5, originó toda una serie de investigaciones encaminadas hacia la síntesis de benzimidazoles de segunda generación, con las modificaciones estructurales necesarias para evitar esta inactivación; este es el caso del cambendazol, que presenta en posición 5 un derivado 5-isopropóxicarbonilamino.

Tras un estudio sistemático de modificaciones del anillo tiazólico en la posición 2 del tiabendazol, investigadores de Smith Kline and French encontraron otra molécula antihelmínticamente eficaz., el compuesto tiocarbonado. A partir de esta observación se sintetizaron los 2-acilaminobencilimidazoles, 2 - benzilimidazol-carbamatos y 2 - benzilimidazolureas, siendo el mas activo, el derivado 2-metil carbamato. Otros compuestos fueron posteriormente sintetizados con este grupo en posición 2 ; uno de ellos fue el parbendazol. Una vez introducida esta molécula en la terapia antihelmíntica, varias casas comerciales sintetizaron nuevos derivados benzimidazólicos; así, aparecieron en clínica, mebendazol, flubendazol y ciclo-bendazol (Raeymaekers y col., 1978; Janssen Pharmaceutical). Albendazol, oxibendazol y fenbendazol fueron sintetizados por Smith Kline and French por Teodorides, y col., 1976; Theodorides col., 1973; Baeder y col., 1974; respectivamente y en Sintex se descubrió el oxfendazol (Averkin y col., 1975), todos ellos recogidos en la figura 1 .

Modelos moleculares revelan que la eficacia de benzimidazoles sustituidos en posición 5 con un grupo propil, depende de la orientación de este grupo y de su momento dipolar. Así, dosis terapéuticas de albendazol, oxibendazol y tioxidazol frente a H. diminuta en ratas, mostraron actividad sobre los estados adultos, en orden creciente; ABZ > OXZ > TIOX (McCracken, 1990a).

En la Figura 3 se muestra un esquema de la síntesis del albendazol (Theodorides, 1970) aunque no es la única vía de síntesis (Barker, 1973).

Debido a la pobre absorción y baja solubilidad en agua que presentan estas moléculas, se han sintetizado profármacos como el metil tiofanato (Delatour, 1986); febantel (Eichler, 1973) y netobimín (Vashí y col., 1983), todos ellos se transforman en benzimidazol carbamatos al administrarse al hospedador, así, netobimín se transforma en albendazol por reducción del grupo nitro por acción de la microflora de intestino (Delatour, 1986).

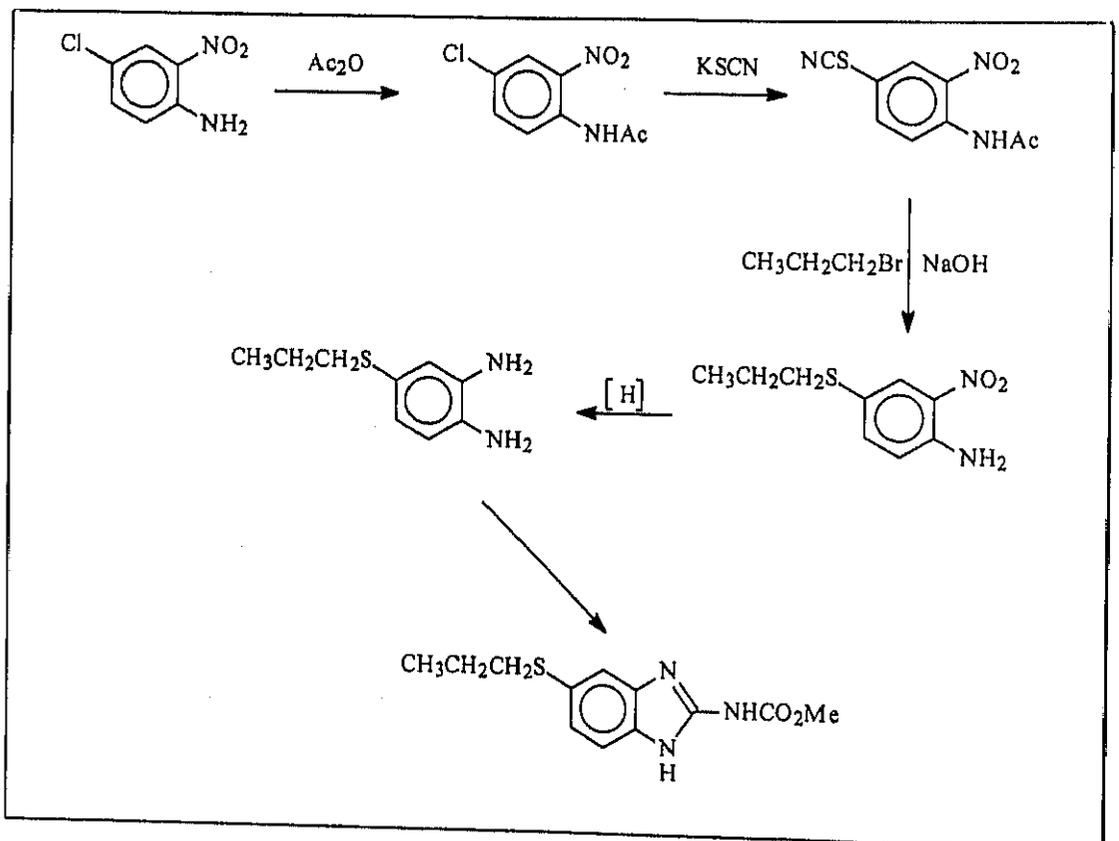


Figura 3. Síntesis del albendazol.

### 2.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE BENZIMIDAZOLES.

El mecanismo de acción de los agentes antihelmínticos, está estrechamente relacionado con aquellas funciones que resultan vitales para el parásito. Los requerimientos fisiológicos para la supervivencia de los nematodos adultos parásitos está restringido a mantener los niveles energéticos apropiados, vía catabolismo de carbohidratos y a mantener un lugar apropiado de alimentación, vía coordinación muscular.

La generación de energía en helmintos envuelve un proceso de fermentación anaeróbica en el cual la ingesta de glucosa es reducida a ácidos orgánicos y a alcohol, siendo esta energía utilizada por el parásito para su motilidad y reproducción. Diferencias en las enzimas implicadas en la respiración y en sistemas de producción energética entre parásito y hospedador, han sido dianas potenciales en la quimioterapia antiparasitaria .

La mayoría de los antihelmínticos disponibles ejercen un efecto antiparasitario por interferir con:

1. Metabolismo energético de parásito.
2. Coordinación neuromuscular.
3. Función microtubular.

Un sitio específico de interferencia en el metabolismo energético es la fosforilación oxidativa de ADP a ATP, para lo cual es preciso la penetración del medicamento en la mitocondria del parásito.

La acción sobre la coordinación neuromuscular es debido a la hiperpolarización de la célula muscular, que será consecuencia de una elevación de la permeabilidad de membrana a los iones cloruro. Este fenómeno es más fácilmente observable en estudios "*in vitro*" (Delatour y col., 1988b) y se traduce en una parálisis espástica del helminto.

Los primeros estudios sobre el modo de acción de los benzimidazoles apuntaban hacia el metabolismo de carbohidratos. Recogidos en la bibliografía existen numerosos datos que avalan esta teoría, estudiando comparativamente el efecto de varios benzimidazoles sobre cepas benzimidazol-resistentes y susceptibles de H. contortus.

Lacey, 1988, en una revisión bibliográfica expone una acción de distintos benzimidazoles sobre el metabolismo anaeróbico, mediante la inhibición del enzima fumarato reductasa por tiabendazol, impidiendo que el NADH en presencia del enzima fumarato reductasa se oxide, bloqueando así, la oxidación celular y el transporte de electrones a nivel de las células (Prichard, 1973); Cambendazol, febendazol, oxfendazol y mebendazol (Malkin y Camacho, 1972 ; Romanowski, Rhoads 1975; Rahman y Bryant, 1977) encontrando una baja sensibilidad en aislamientos benzimidazol-resistentes.

Benzimidazoles y derivados también han demostrado inhibir la recaptación de glucosa tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" en numerosas especies de helmintos tales como :- A. summ., T. spiralis, S. mansoni, M. expansa y H. diminuta, en algunos casos asociado a una depleción de los niveles de glucógeno compensatorio de los parásitos, reserva energética indispensable; este efecto junto con la acumulación de acetil-colinesterasa, ha sido también observado con albendazol, parbendazol, oxibendazol y oxfendazol. Una inhibición en la captación de glucosa fue vista en F. hepatica, T. colubriformis, N. dubius, H. contortus (Behm y Bryant, 1985). Sin embargo Lacey concluye que, a pesar de la diversidad de efectos de los benzimidazoles a nivel bioquímico y celular; el principal modo de acción de estos fármaco es por interacción con una proteína citoesquelética de eucariotas "la Tubulina".

Estudios recientes han demostrado que este mecanismo es el más importante, ya que tanto la inhibición del enzima fumarato reductasa como el transporte de glucosa van a originar una alteración de los microtúbulos citoplasmáticos, por acción sobre la tubulina, produciéndose entonces la autólisis de la célula.

La tubulina es la subunidad funcional de los microtúbulos, que participan en funciones tan importantes como, transporte de materiales dentro de la célula. Si los benzimidazoles inducen la desaparición de los microtúbulos, se produce un bloqueo

en el transporte de las vesículas secretoras en las células del tegumento o intestino de los helmintos, lo que puede producir una alteración en las membranas, seguido de una disminución en la absorción y digestión de los nutrientes.

La tubulina es una proteína dimérica, formada por dos subunidades alfa y beta-tubulina, pertenecientes a un grupo de proteínas heterogéneo, aunque han demostrado poseer grandes homologías en distintas especies, por ejemplo Jiménez-González, 1991 encontró un mismo perfil electroforético entre la tubulina de T. spiralis y la tubulina cerebral de cerdo.

Los microtúbulos están en equilibrio dinámico con la tubulina y la relación entre la tubulina dimérica y polimérica es controlada por proteínas reguladoras endógenas y cofactores. Este equilibrio puede ser alterado "*in vivo*" e "*in vitro*" por sustancias exógenas conocidas como inhibidores. La mayoría ejercen su acción bloqueando la propia asociación de las subunidades de la tubulina dentro de crecimiento microtubular, el inhibidor se une a la porción terminal del microtúbulo preparado para asociarse, mientras la disociación de los microtúbulos continúa por el lado opuesto, lo que produciría una pérdida neta de la longitud total del microtúbulo (Lacey, 1990).

Los inhibidores microtubulares pertenecen a un grupo muy diverso, estructuralmente. Producidos por hongos, plantas, organismos marinos, animales eucariotas o de origen sintético, demostraron poseer alto espectro de selectividad por la tubulina de helmintos y no toxicidad selectiva para células eucariotas.

Borgerds y Nollin, 1975a fueron los primeros que observaron la desintegración de la matriz microtubular en las células intestinales de A. summ tratadas con mebendazol. Posteriores estudios realizados por Borgerds y col., 1975; Verhyen y col., 1976 confirmaron este hecho para otros benzimidazoles. Al mismo tiempo, otros investigadores pertenecientes a Janssen Pharmaceutical observaron que el nocodazol (análogo del mebendazol) era un potente inhibidor de la tubulina de mamíferos.

La cinética de unión del mebendazol y nocodazol a la tubulina cerebral ha sido descrita usando técnicas de gen filtración y diálisis. Los benzimidazoles se unen a

la tubulina por los mismos lugares que otras sustancias como colchicina y podofilotoxina, ambos potentes ligandos microtubulares, y sus respectivos análogos (Lacey, 1988) en orden decreciente de afinidad: - colchicina > benzimidazoles > podofilotoxina; resultados que concuerdan con los obtenidos por Jiménez-González y col., 1991, quienes realizaron estudios con colchicina en su asociación con la tubulina del nematodo T. spiralis, observando una unión similar a la descrita para otros nematodos. Los benzimidazoles inhiben competitivamente la unión de la colchicina a la tubulina, siendo el mebendazol el inhibidor más potente (Cte de inhibición  $1,4 \cdot 10^{-7}$  M), seguido en orden decreciente por oxibendazol, albendazol y fenbendazol ( con valores de Ctes de inhibición de  $2,9 \cdot 10^{-7}$  M ,  $6,5 \cdot 10^{-7}$  M y  $3,9 \cdot 10^{-6}$  M respectivamente) y mostrando una afinidad por la tubulina mayor que la podofilotoxina (Cte de inhibición  $1,3 \cdot 10^{-6}$ ). Por otro lado, valores mas altos de Ctes de inhibición fueron descritos en la interacción de los benzimidazoles con la tubulina cerebral de cerdo.

Mientras que, como hemos visto, los benzimidazoles muestran gran afinidad por las tubulinas de parásitos, esta afinidad es mucho menor para las tubulinas de mamíferos, lo cual parece ser debido a una diferente farmacocinética de los benzimidazoles en parásito y hospedador (Kholer y Bachmann, 1981). Sin embargo, otros autores indican diferencias entre las formas isomórficas de las tubulinas de mamíferos y nematodos parásitos (Tang y Prichard, 1988a; 1989), lo que podría explicar la diferente interacción de los benzimidazoles con las tubulinas en parásitos y hospedador. Estudios realizados con oxfendazol y tiabendazol mostraron una tan baja afinidad por la tubulina de mamíferos, que resultaba insuficiente para bloquear la polimerización tubular.

Finalmente McCracken P.O, 1991, propone que la actividad antihelmíntica del albendazol y otros derivados benzimidazólicos, en parte, puede ser debido a una interferencia en el sistema bioenergético resultante del intercambio protónico transmembrana.

### **2.2.3 FARMACOCINETICA DE BENZIMIDAZOLES : ALBENDAZOL**

Los conceptos de farmacocinética y biodisponibilidad son importantes en la investigación biomédica de nuevos fármacos, así como en el uso clínico óptimo de las nuevas formulaciones de los mismos. La farmacocinética es el estudio de las cinéticas de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de medicamentos. La biodisponibilidad indica el grado y la cantidad de medicamento que ha alcanzado la circulación general.

Para obtener un rendimiento máximo en cuanto a eficacia se refiere, tras la administración de un fármaco, debemos controlar una serie de parámetros referentes a la serie L.A.D.M.E.

#### **2.3.1 Administración, absorción y distribución.**

Los agentes antihelmínticos son corrientemente administrados en dosis únicas por distintas vías. La baja solubilidad en agua de algunos antihelmínticos ha sido el gran inconveniente para la elaboración de formulaciones de administración parenteral a animales domésticos, que no resultaran irritantes.

Asimismo, se ha sustituido el uso de dosis únicas simples por otras alternativas, como puede ser la incorporación del medicamento en la alimentación o en el agua de bebida, para su administración en dosis inferiores y prolongadas. Un inconveniente mayor que el propio sistema de administración, sería la diferencia de consumo individual entre animales.

Existen otros sistemas de administración, en dosis únicas, mediante la inyección intraruminal (administración a nivel entérico por vía parenteral)(Borgsteede y Reid, 1982), disponibles comercialmente para oxfendazol, fenbendazol y albendazol. Esta permitiría una administración rápida y fácil, así como, evitaría la posibilidad de un "by pass" vía surco esofágico, tras la administración oral. Mas recientemente se han desarrollado otras formas de administración, mediante un dispositivo, el cual queda retenido en el rumen, o mas precisamente en el retículo adyacente. Estas liberan

su contenido de una forma continúa o de una manera pulsátil. El objetivo de estas formas de administración es reducir costes asociados al tratamiento de un gran número de animales, así gozan de una serie de ventajas como facilitar la administración, reduciendo la frecuencia de los tratamientos; prolongar la duración de la acción antihelmíntica manteniendo unas concentraciones plasmáticas estables, evitando fluctuaciones y limitar los niveles residuales. Sin embargo surgen una serie de inconvenientes asociados a la aparición de formas resistentes; la inducción enzimática acelera la degradación de medicamentos pudiendo producir un daño potencial (Dorchies, 1990). Los diferentes regímenes de dosificación influyen en la actividad antihelmíntica de los fármacos, así la infusión continúa de albendazol a rumiantes resulta mas eficaz en el control de parásitos, que la administración de dosis simples o dosis simples diarias (Kwan y col., 1988).

Si bien, muchos parásitos residen en el lumen gastrointestinal, otros se ubican en puntos mas alejados del intestino como el hígado o los pulmones; en donde, para que el antihelmíntico realice su acción, es esencial la absorción del mismo.

El epitelio gástrico, al igual que el epitelio intestinal, actúa como una barrera lipófila frente a la absorción del albendazol y mebendazol. Estudios "*in vivo*" realizados en ratas administrando albendazol por perfusión intestinal con recirculación y a nivel gástrico sin recirculación (Prieto, 1988), demostraron una mayor absorción a nivel estomacal, alcanzando concentraciones mayores en sangre que cuando esta absorción se producía a nivel intestinal. Prieto, 1991 indica que la absorción del albendazol es debido a un proceso de difusión simple; la baja adsorción intestinal y gástrica del albendazol se debe a su limitada solubilidad en los fluidos gastrointestinales (Marriner, 1986; Prieto, 1991).

La absorción del albendazol a nivel estomacal es debida a que la solubilidad de éste es mayor en medios ácidos, luego podemos favorecer esta absorción enlenteciendo el vaciamiento gástrico, por una dieta rica en grasas (Ali, 1992). Coincidiendo con los resultados obtenidos por Marriner y col., 1986; Lange y col., 1988 en estudios farmacocinéticos con albendazol en humanos, observaron un aumento en la biodisponibilidad de éste, cuando era administrado junto con alimentos grasos, sugiriendo además que el proceso de absorción requiere bilis y en

consecuencia una circulación enterohepática anómala puede afectar a los procesos de absorción y eliminación, recomendando una monitorización de pacientes con equinocosis para prevenir efectos secundarios del antihelmíntico (Cotting y col.,1990).

Las interacciones producidas en la terapia con albendazol administrado junto con alimentos grasos han sido descritas por numerosos autores, así, Awadzi y col.,1994, observan un aumento de cuatro veces en la biodisponibilidad del albendazol, cuando se administraba junto con comidas grasas, a pacientes con oncocercosis. Homeida y col.,1994, observaron un efecto sinérgico en cuanto eficacia antiparasitaria frente a parásitos intestinales, al administrar praziquantel 40 mg/kg y albendazol 400 mg/kg; describiendo una modificación en el parámetro ABC (cero-infinito) para ambos fármacos según el tipo de terapia, así, en presencia de comida el ABC de praziquantel se incrementó en 2,6 veces, 8 veces en el caso del albendazol; el ABC de ABZSO se incrementó en 4,5 veces tras la administración conjunta de ABZ y PZQ y 12 veces en la terapia triple (albendazol + praziquantel + comida).

También se ha demostrado que el herbario en rumiantes tras el tratamiento con albendazol, actúa como un depósito del fármaco, permitiendo mantener concentraciones plasmáticas durante períodos de tiempo prolongados. La producción de una forma amorfa de oxfendazol por tratamiento con ácidos (Chick y col.,1987) permitió que tras la administración oral, se produjese una rápida y completa absorción comparada con la forma cristalina; además se duplicó la actividad antihelmíntica.

Existen otras sustancias que aunque no afectan a la cinética de absorción del albendazol (simple difusión), si que producen una disminución en el grado de absorción; como en el caso del etanol, administrado de forma aguda o crónica a ratas (Justel y col.,1994) a excepción del etanol al 5 % , ya que en este caso se observa una mejor solubilización del fármaco.

Durante la fase intestinal de T. spiralis, se produce una disminución en el Ph debido al proceso inflamatorio, el cual favorece la solubilidad de los benzimidazoles y como consecuencia, una mayor biodisponibilidad biológica y una mas lenta

eliminación, mientras que la absorción no se ve influenciada (Velebný y col, 1992).

La mayoría de los compuestos benzimidazólicos muestran una unión a las proteínas plasmáticas menor del 50 % (unión del albendazol a seroalbúmina y hemoglobina bovina < 10% Galtier y col., 1991). Albendazol y sus metabolitos son ampliamente distribuidos, sulfóxidos y sulfonas penetran en las células sanguíneas y tejidos, debido a su diferente polaridad y liposolubilidad (Galtier 1991; Lanusse and Prichard, 1993a); esta propiedad podría contribuir a una actividad antihelmíntica frente a parásitos localizados en tejidos como; pulmón, sistema hepatobiliar, pared gastrointestinal.

### 2.2.3.2 Metabolismo y excreción

Los antihelmínticos benzimidazólicos son ampliamente metabolizados en todas las especies de mamíferos estudiados. Siguiendo un patrón común, aunque los porcentajes de sus metabolitos varían substancialmente (Delatour, 1986), los benzimidazoles, tras su administración se caracterizan por una corta semivida, con predominio de sus productos metabólicos en plasma y tejidos, así como, en excreciones (Fetterer y Rew, 1984; Gottschall, 1990). Los metabolitos se encuentran en orina o heces aunque la presencia en este último, se debe mas a su baja absorción que a la excreción biliar.

Los metabolitos primarios son producto de un proceso de oxidación e hidrólisis, resultando moléculas mas polares y solubles en agua que los productos de partida. Posteriormente, se produce una II fase de conjugación, importante en la detoxificación de los productos derivados de benzimidazoles. Los metabolitos producto de la oxidación e hidrólisis son conjugados con glucurónido o/y sulfato, produciendo un incremento de polaridades (Hennessy, 1985, 1989), lo que facilita la excreción urinaria o biliar.

Estas reacciones son catalizadas por enzimas microsomales o citosólicas, siendo su actividad influenciada por factores externos (edad, sexo, patologías, asociaciones terapéuticas etc.), con variaciones interindividuales o interespecificas.

Las monooxigenasas de función mixta se encuentran ensambladas en el interior de la bicapa lipídica del retículo endoplasmático o en las mitocondrias. Estas, catalizan diversas reacciones de oxidación de sustratos tanto exógenos como endógenos.

El citocromo P450 microsomal es un elemento catalítico terminal de un sistema oxidativo de la cadena de transporte electrónico y requiere para su actuación, la presencia de una reductasa, a la cual está íntimamente ligada.

Otras proteínas enzimáticas implicadas en las reacciones de fase I, son las flavín monooxigenasas, las cuales catalizan las N- y S- oxidaciones, las xantín-oxidasas y alcohol deshidrogenasas del citosol o las monoamino oxidasas y glutations peroxidasa contenidas en las mitocondrias.

La presencia del átomo de azufre en benzimidazoles sustituidos en posición 5, les caracteriza por un proceso de sulfoxidación hepática, aunque el proceso de biotransformación por una oxidación en el heteroátomo nucleofílico de azufre puede producirse en otros tejidos. Fenbendazol, albendazol y triclabendazol administrados como tal o como profármacos (febantel o netobimin), son metabolizados a sus respectivos sulfóxidos por las flavín monooxigenasas microsomales y a sulfonas por un proceso dependiente del citocromo P450 (Hennessy y col., 1987; Souhaili-El Amri y col., 1987, 1988; Short y col., 1988a; Delatour, 1990b; Lubega, 1991). La reacción inversa de reducción de sulfóxidos en sulfuros, se ha descrito en el tracto gastrointestinal para albendazol, triclabendazol y fenbendazol.

La hidrólisis de la función carbamato constituye la ruta de metabolización principal de flubendazol, fenbendazol y albendazol, permaneciendo su metabolito 2- amino sulfona y derivados, en los tejidos.

En algunos casos las reacciones metabólicas también afectan al anillo benzimidazólico como en el caso de la N-metilación de tiabendazol y albendazol (Galtier, 1991 a). Los benzimidazoles que portan una cetona en posición 5, como mebendazol y flubendazol sufren una fuerte reducción a alcoholes por las cetona-reductasas.

### 2.2.3.2.1 Consideraciones sobre el metabolismo del albendazol.

En la figura 5 se observan algunas de las rutas metabólicas del albendazol.

La presencia del átomo de azufre en la cadena lateral del albendazol tiene una gran importancia en su metabolismo, puesto que la sulfoxidación de este átomo es la ruta metabólica mas importante de este fármaco (Gyurik y col., 1981).

Estudios previos demostraron la existencia de un proceso oxidativo a nivel de los microsomas hepático de ratones (Douch y Buchanan, 1979), atribuyendo este proceso a un citocromo P450-dependiente de monooxigenasas, pero estudios posteriores demostraron, que la sulfoxidación del albendazol para convertirlo en su metabolito activo, albendazol sulfóxido, corría a cargo de un citocromo flavín monooxigenasa (FMO) (Ziegler, 1980; Hajjar y Hodgson, 1980) que a diferencia del P450, carece del grupo hemo.

En estudios " *in vitro* ", realizados con microsomas hepáticos de ratas, se apreció una rápida oxidación NADPH dependiente que originaba el sulfóxido (Fargetton.X y col., 1986). Los efectos producidos por agentes inductores e inhibidores de la sulfoxidación del albendazol han sido utilizados como método cualitativo para el análisis del papel del citocromo P450 dependiente de monooxigenasas y flavín monooxigenasas en el metabolismo de este. Así, la formación del sulfóxido se inhibe con clorpromacina, fenbendazol, metimazol, tiabenzamida y tranilcipromina (sustratos alternativos del FMO) mientras que metirapona, SkF 525A, monóxido de carbono e imidazol (inhibidores clásicos del citocromo P450) no modifican la sulfoxidación. Estos datos demuestran que el proceso de sulfoxidación no es catalizado por un sistema citocromo P450-dependiente de monooxigenasas, el sistema enzimático implicado corresponde a las flavín monooxigenas.

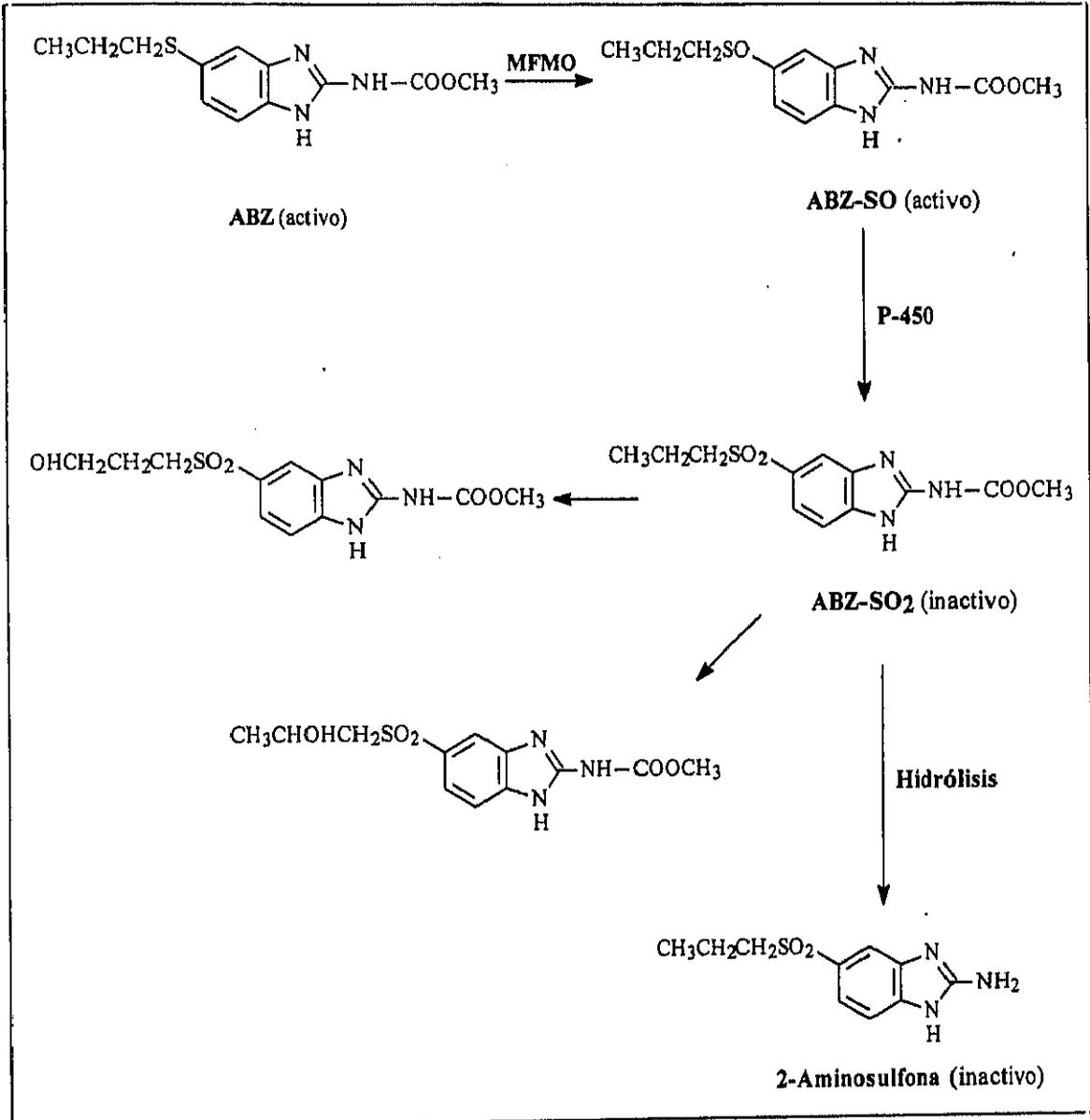


Figura 5. Algunas de las rutas metabólicas del albendazol.

Estudios posteriores del metabolismo del albendazol, llevados a cabo por Amri y col., 1987, con microsomas de hígado de cerdo y con formas purificadas de los citocromos P450 y FMO indican que ambos sistemas contribuyen a la oxidación inicial del albendazol. La actuación del P450 se ve confirmada al reducirse la formación del sulfóxido por adicción de un anticuerpo contra la reductasa P450.

El citocromo P450, en una reacción bifásica, es el encargado de oxidar el sulfóxido a sulfona, en un segundo paso mas lento e irreversible (Souhaili-El-Amri y col., 1988); sin embargo esta segunda fase puede diferir en los diferentes hospedadores.

Sucesivas oxidaciones del albendazol conducen a la formación de metabolitos más polares y menos activos. En términos de unión a las tubulinas del parásito, uno de los modos de acción putativos de los benzimidazoles, el albendazol de partida es mas potente que el sulfóxido, mientras que la sulfona es inactiva antihelmínticamente (Lacey, 1990; Lubega y Prichard, 1991). Por tanto la oxidación del albendazol a albendazol sulfóxido y posteriormente a sulfona, se traduce en una considerable disminución de la actividad antihelmíntica.

Tanto la sulfona como el sulfóxido son los metabolitos predominantes en plasma, siendo también los metabolitos mayoritarios en orina. Las proporciones de ambos metabolitos varían según la especie en la que se realice el ensayo. Delatour y col., 1991, encontraron una menor biodisponibilidad del albendazol sulfóxido en cabras respecto a los valores encontrados en ovejas, lo que coincide con los resultados obtenidos con oxfendazol por Bogan y col., 1987.

La rápida aparición del sulfóxido de albendazol en plasma es atribuible a un efecto de primer paso hepático previo a la absorción del albendazol, hecho por el cual el albendazol solo se encuentra en sangre en trazas (Lanusse y col., 1991; Delatour y col., 1990; Lanusse y Prichard, 1990, tras la administración de netobimín o albendazol a ganado ovino y bovino). La eficiente sulfoxidación del albendazol por los microsomas hepáticos de ganado (Galtier y col., 1986) también puede ser explicada por la rápida desaparición del albendazol en plasma, tras la administra-

ción intravenosa a ganado vacuno (Galtier y col., 1991). Sin embargo la sulfoxidación puede tener lugar también en el tracto gastrointestinal (Lanusse y col., 1992; Delatour y col., 1986), así como en tejidos y fluidos extrahepáticos (Galtier y col., 1991).

Por otra parte, puede existir un intercambio entre plasma y fluidos gastrointestinales de ambos metabolitos: albendazol y sulfóxido, por un proceso de difusión dependiente del Ph (Lanusse y col., 1992b), o porque el sulfóxido sea segregado por la bilis, siendo reducido a albendazol por las bacterias gastrointestinales. Esta reducción puede ser de gran importancia para la terapéutica de parásitos gastrointestinales, por convertir el sulfóxido en el compuesto de partida, más activo farmacológicamente, ya que el albendazol muestra una mayor afinidad por la tubulina; de hecho, McKellar and Scott, 1990 encontraron eficacias similares para ABZ, ABZSO y netobimin en el tratamiento de nematodos de ovejas y ganado vacuno.

Es importante señalar que la relación ABZSO/ABZSO<sub>2</sub> es un buen indicador de la oxidación del producto de partida, así como de la relativa abundancia de ambos metabolitos en plasma. Esta relación decrece al administrar albendazol durante tiempo prolongado a ovejas, comparado con la administración de dosis únicas (Delatour y col., 1990), en ratas (Souhaili-El-Amri y col., 1988) y a humanos con equinococosis (Steiger y col., 1990); este hecho es atribuible a un proceso de autoinducción del sistema microsomal hepático, causado por la prolongada presencia de ABZ o ABZSO, la cual conduce a un incremento en la sulfoxidación, produciendo un aumento de las concentraciones plasmáticas de ABZSO<sub>2</sub> y una disminución de las de ABZSO. Esta inducción enzimática se evidenció por la medida de la actividad enzimática de monooxigenasas y su concentración por la técnica de E.L.I.S.A, antes y después del tratamiento sostenido con albendazol (10,6 mg/kg/día) a ratas (Souhaili-El-Amri y col., 1988), comprobándose un incremento en la actividad de monooxigenasas por el aumento en la concentración de la hemoproteína " citocromo P450c ". En hepatoma de líneas celulares en humanos, ABZSO y menos ABZSO<sub>2</sub>, induce la actividad del citocromo P-448 y UDP-glucuroniltransferasa. La administración de OFZ a conejos durante 10 días consecutivos, a las dosis comprendidas entre 4,5 y 22,5 mg/kg/día, indujo un incremento de la concentración total del citocromo p450 hepático y más específicamente, de la familia

P450IA y sus correspondientes monooxigenasas (Gleizes y col.,1991). El tratamiento del cultivo de hepatocitos de conejos con OFZ (10mM) induce los isoenzimas P450IA1, IA2 y IIIAG como lo demuestra el incremento en los niveles de ARNm que codifica para estos tres isoenzimas del P450 (Gleizes y col.,1991). Un efecto inductor del metabolismo hepático por parte de benzimidazoles y sus sulfóxidos puede tener un impacto negativo en la eficacia clínica de estos compuestos.

La oxidación del albendazol para dar lugar a la sulfona es sin duda la reacción metabólica mas importante, pero una vez que ha tenido lugar, existen otras rutas tan importantes como ésta. El metabolito 2- amino sulfona, consecuencia de la oxidación del azufre y la hidrólisis del grupo carbamato, se ha encontrado en todos los mamíferos, excepto en ratón, en alto porcentaje. Existen otros metabolitos "sulfona" resultantes de la hidroxilación de la cadena lateral (Gottschall, 1990)

En la figura siguiente se propone las rutas metabólicas y distribución del albendazol y sus metabolitos después de la administración oral de netobimin. FMO = flavín monooxigenasas; P450 = citocromo P450.

	Bacterias		gastrointestinales		
	NTB →	ABZ ↔	↔ ABZSO	→ ABZSO2	Tracto G.I
Hígado		ABZ bilis	↓	↓	Plasma
FMO		↓	↓	↓	
		ABZSO =	= ABZSO		
Cit P450		↓		↓	
		ABZSO2 =	=	ABZSO2	

El porcentaje de excreción urinaria, con respecto del total, también varía en las diferentes especies animales, alcanzando valores tan dispares como el 59,1 %, observado en vacas y el 19,5 % de ratones (Gyurik, 1981). El metabolito mayoritario en orina de vacas, ratones, ovejas y ratas es el albendazol, con porcentajes que varían entre el 22,9 y 26,6 %, mientras que la sulfona constituye tan solo el 6 %

de los metabolitos excretados. La excreción fecal del albendazol puede ser debida al porcentaje de fármaco no absorbido o a la existencia del ciclo enterohepático.

#### 2.2.3.2.2 Quiralidad en la molécula de albendazol sulfóxido.

Es interesante hacer referencia a los estudios que se han llevado a cabo a fin de comprobar la importancia de la quiralidad de los metabolitos sulfóxido de albendazol; ya que todos los pasos en farmacocinética se han descrito enantiómero-dependiente ( absorción, unión a receptores, biotransformaciones y aclaramientos); además la estereoquímica en terapéutica advierte que los enantiómeros exhiben efectos cuantitativa y cualitativamente distintos.

La molécula de albendazol sulfóxido presenta un centro de asimetría (R - :SO: - R'), lo que ha originado que, en el plasma de distintas especies animales tratadas con albendazol, se hayan identificado dos enantiómeros (Delatour y col., 1990a, 1991). En plasma de ovejas el cociente (+) ABZSO/(-) ABZSO extrapolado a tiempo cero fue de 75/25, sin embargo en ratas, perros y hombres apareció la mezcla racémica (Delatour, 1991b), después el enantiómero (+) R predominaba en hombres y perros, mientras que en ratas lo hacia el (-) R. Esta diferencia en la relativa concentración de cada enantiómero ha sido relacionada con la relativa contribución de la flavín monooxigenasa y citocromo P450 respectivamente, a la sulfoxidación del albendazol (Delatour y col., 1991). Aun más, estos autores han sugerido, que (-) ABZSO más que el (+) ABZSO, podría ser el sustrato del citocromo P450 para la formación de la sulfona, lo cual estaría relacionado con un incremento lineal en la concentración del enantiómero (+) en tiempos más tardíos ( relación (+)/(-) para humanos 80/20 y 70/30 para perros), mientras que el sistema flavín monooxigenasa es el responsable de la aparición del segundo enantiómero, es decir, del (+) ABZSO (Galtier y col., 1986) en ovejas, el cuál se encuentra en un 86 % del total de los niveles plasmáticos de ABZSO (Delatour y col., 1991). Este supuesto fue descrito con anterioridad por Waxman, 1982; Light, 1982, mediante estudios "in vitro" al incubar el sustrato 4-tolil etil sulfóxido (estructura relacionada químicamente con ABZ) con citocromo P450 de ratas, obteniendo selectivamente el enantiómero (+), mientras que el segundo aisló el (-) ABZSO tras

la incubación con FMO. Probablemente, al menos en ratas y posiblemente en perros y humanos (Delatour, 1991b), ambos sistemas enzimáticos actúan simultáneamente de modo que la concentración de ABZSO extrapolada a tiempo cero sea la racémica.

Los cambios producidos en las concentraciones plasmáticas totales de (+)/(-) con el tiempo, podrían ser consecuencia de una enantioselectividad por el sustrato del citocromo P450, dependiente de la reacción de sulfoxidación (Souhaili-El-Amri y col., 1988; Auret y col., 1968). De acuerdo con esta interpretación, la selectiva consumición de uno de los enantiómeros de ABZSO, es responsable del incremento proporcional de su antípodo.

Por último, hacer la observación, de que todavía se desconoce cual de estos dos enantiómeros es el responsable de la actividad farmacológica, aunque algunos autores apuntan hacia el (+) ABZSO (Bogan, 1980; Delatour y col., 1991) por ser el enantiómero que mayormente se encuentra en plasma, mientras que el (-) ABZSO lo haría en menor grado.

#### **2.2.3.2.3 Efecto de inhibidores enzimáticos en el metabolismo del albendazol.**

Son muchas las sustancias que han demostrado tener un efecto inductor o inhibidor sobre el sistema microsomal hepático, y como tales han sido utilizados para estudiar las distintas rutas metabólicas de los fármacos en modelos "*in vitro*". "*In vivo*", la interferencia en el proceso de sulfoxidación hepática puede producir una modificación en la farmacocinética de los fármacos. Este hecho podría mejorar la eficacia antiparasitaria como resultado de una más alta concentración de metabolitos antihelmínticamente activos, una mayor permanencia de estos en el hospedador y como consecuencia un mayor tiempo de contacto entre fármaco y parásito.

Muchos fármacos han mejorado su farmacocinética tras la coadministración con otras sustancias. Así, la potenciación del OFZ por coadministración de PBZ a ovejas, se traduce en un incremento en el ABC, C<sub>max</sub> y eficacia clínica (Hennessy y col., 1985). PBZ se une fuertemente a la tubulina de mamíferos y esto permite que, de forma temporal, disminuya el metabolismo hepático y la excreción biliar

de OFZ. Esto se traduce en un incremento en la actividad antiparasitaria frente a cepas BZ-resistentes de *H. contortus* y *T. colubriformis*, tras el tratamiento combinado OFZ+PBZ, comparado con la administración de OFZ solo. Actualmente Lanusse y col., continúan estudiando la mejora de la farmacocinética de distintos benzimidazoles (OFZ y FBZ) y probenzimidazoles (NTB) mediante la utilización de inhibidores metabólicos tales como metimazol<sup>R</sup> (MTZ) y metirapona<sup>R</sup> (MTP). Nosotros nos limitaremos a los estudios realizados con netobimin (profármaco del albendazol) y a los inhibidores utilizados por nosotros en la realización de esta tesis, dado que carecemos de información acerca de la utilización de inhibidores del metabolismo del albendazol como moduladores de su farmacocinética.

Metirapona, es un fármaco anti-esteroídico que ha demostrado ser un potente inhibidor de la actividad del sistema microsomal hepático (Tynes and Hodgson, 1983); actuando a nivel del citocromo P450, forma complejo con él, sin efecto en los componentes de transferencia electrónica (Kahl y Netter, 1970).

SKF-525A, inhibe el citocromo P450 indirectamente: un metabolito reacciona con el P450 formando un complejo, el cual, evita la fijación del átomo de oxígeno y como consecuencia la activación (Testa, 1980).

Metimazol y otras tioureas son fármacos antitiroideos, conocidos sustratos del sistema flavín dependiente de monooxigenasas. La biotransformación FMO-dependiente del metimazol, produce un metabolito con afinidad por el citocromo P450, éste se une a él, bloqueando la entrada de otros sustratos (Kedderis and Ricker 1985).

Estudios recientes han demostrado que la coadministración de netobimín con metimazol, produce cambios en las cinéticas plasmáticas de albendazol y metabolitos, debido a una competición de ambas sustancias (ABZ y MTZ) por el sistema FMO, en ovejas (Lanusse and Prichard, 1992a) y ganado bovino (Lanusse and Prichard, 1992b), manifestando una modificación mayor en las ovejas tratadas.

En la tabla siguiente se representan los parámetros farmacocinéticos para ABZSO siguiendo la administración de netobimín y/o metimazol a ovejas y ganado bovino.

Especie	Tratamiento	Dosis	ABC	t <sub>1/2</sub>
ovinos	netobimin	20mg/kg oral	99,45	10,26
	netobimin + metimazol	20 / 1,5mg/kg intramuscular	193,2	50,27
bovinos	-netobimin	20mg/kg oral	9,93	5,71
	netobimin + metimazol	20 / 1,5 mg/kg intramuscular	12,96	8,64

Mas de un 82 % de inhibición en la formación de ABZSO fue obtenido "in vitro" a la concentración 1mM de MTZ, mientras que la concentración 10  $\mu$ m no manifestó ningún efecto. En microsomas de ganado bovino, la concentración 1mM de MTZ inhibe la sulfoxidación del ABZ en un 56 % , en las mismas condiciones del ensayo (Lanusse y Prichard, 1993). Estos resultados indican que la sulfoxidación del albendazol en los microsomas hepáticos de ovejas, es significativamente mas alta que en ganado bovino, por lo que es necesario utilizar mayores concentraciones de MTZ en el tratamiento del ganado para obtener un nivel similar de inhibición.

Los resultados obtenidos en los estudios "in vitro", han demostrado ser reproducibles en modelos "in vivo" (Lanusse and Prichard 1991, 1992a).

El incremento en el área bajo la curva de ABZSO, resultó significativamente mayor tras la administración de netobimín mas los inhibidores a ovejas, existiendo una variación según la vía de administración. Así se obtuvo el 63 y 58 % de incremento tras el tratamiento con NTB a 20 mg/kg subcutánea mas MTZ 1,5 mg/kg y MTP a 20 mg/kg respectivamente, en relación al tratamiento con netobimín solo (Lanusse and Prichard 1991); 55 % en la administración conjunta de netobimín a 7,5 mg/kg oral mas MTZ a 3 mg/kg intramuscular (Lanusse y Prichard 1992c) y 94 % tras la administración de NTB a 20 intraruminal mas MTZ a 1,5 mg/kg intramuscular (Lanusse and Prichard 1992a); en este caso también se produjo un aumento de biodisponibilidad del albendazol (el ABC aumentó en un 138 % y el tiempo medio de permanencia fue un 86 % mayor).

Otros parámetros farmacocinéticos modificados fueron, la semivida de eliminación del ABZSO, que pasó de 7,27 horas, tras la administración de NTB solo a 14,57 horas (NTB +MTZ oral) ó 11,39 horas (NTB +MTZ intramuscular) (Lanusse and Prichard 1992c).

Como se ha señalado anteriormente, el cociente ABC ABZSO/ABZSO<sub>2</sub> es un indicador de la abundancia de ambos metabolitos en sangre y este puede decrecer como consecuencia de un proceso de autoinducción enzimática, tras la administración de dosis sucesivas de albendazol, lo que produciría un aumento en las concentraciones plasmáticas de la sulfona y una considerable disminución del sulfóxido. Contrariamente, se produce un incremento de este cociente tras la administración de netobimín más metimazol.

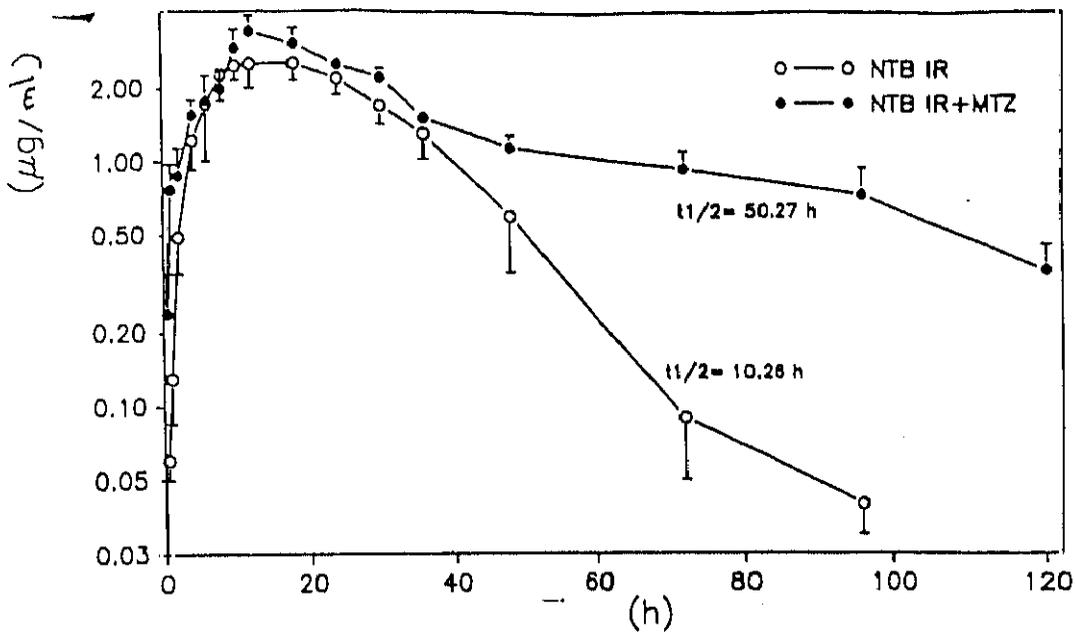
El MTZ es un inhibidor del sistema FMO, responsable de la formación del enantiómero (+)R en ovejas, por lo cual se produciría una reducción en el efecto de primer paso hepático. Un retraso en la oxidación del ABZ por la presencia del MTZ puede ser suficiente para enlentecer la formación de ABZSO e incrementar el cociente ABZSO/ABZSO<sub>2</sub>. Aún más, "*in vitro*" se ha demostrado una reducción del ABZSO para transformarse en el albendazol de partida, luego un retraso en la formación del sulfóxido, prolonga el tiempo de reciclaje entre plasma y fluidos gastrointestinales, lo cual permite que se forme nuevamente ABZ, por reducción del ABZSO en el tracto digestivo; este hecho ayuda a explicar el retraso en la aparición de la sulfona en plasma, obtenido tras la administración de netobimín más metimazol.

En las figuras siguientes se representa, como ejemplo ilustrativo del efecto del MTZ en la cinética del albendazol, las medias de las concentraciones plasmáticas de albendazol (a), albendazol sulfóxido (b) y sulfona (c) (Figura A) después de la administración intraruminal de netobimín (20 mg/kg) más metimazol (1,5 mg/kg) por vía intramuscular a ovejas (Lanusse and Prichard 1992a), así como de la media de las concentraciones plasmáticas de ABZSO, obtenidas tras la administración de netobimín (20 mg/kg) subcutánea y la coadministración con MTZ (1,5 mg/kg intramuscular) y MTP (20 mg/kg subcutánea) a ovejas (Figura B)(C.E Lanusse,

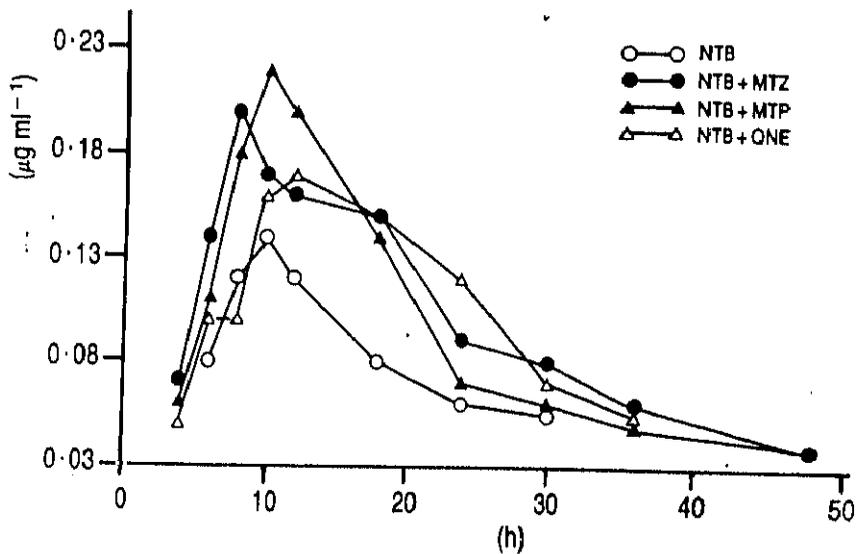
1991). Nótese el aumento en la biodisponibilidad y tiempo de permanencia de ambos metabolitos en el organismo, tras la terapia conjunta fármaco mas inhibidor. En la Figura C, se realiza un estudio comparativo de la inhibición de la sulfoxidación del albendazol, en distintos tipos de ganado (Lanusse and Prichard, 1993).

"*In vivo*", el papel del MTP en la oxidación del albendazol parece ser debido a la inhibición del citocromo P450 envuelto en la producción del enantiómero (-)R y su posterior oxidación a sulfona.

"*In vitro*", la sulfoxidación del albendazol por microsomas hepáticos de rata no se ve afectada por MTP o SKF 525A (Tynes y Hodgson 1983). Esto podría indicar que los cambios observados en la farmacocinética del netobimin en presencia de MTP son debidos a interferencias "*in vivo*" con la formación de ABZSO<sub>2</sub>, lo cual produciría un significativo aumento del ABC del ABZSO y una disminución de ABZSO<sub>2</sub>.



**Figura A:** Media de las concentraciones plasmática de ABZSO obtenidas despues de la administración intraruminal de NTB (20 mg/kg) solo y coadministrado con MTZ (i.m, 1,5 mg/kg) a ovejas.



**Figura B:** Medias de las concentraciones plasmáticas (n=4) de ABZSO obtenidas tras la admistración subcutánea de NTB (20 mg/kg ) solo o coadministrado con MTZ (1,5 mg/kg i.m) o MTP (20 mg/kg s.c) a ovejas.

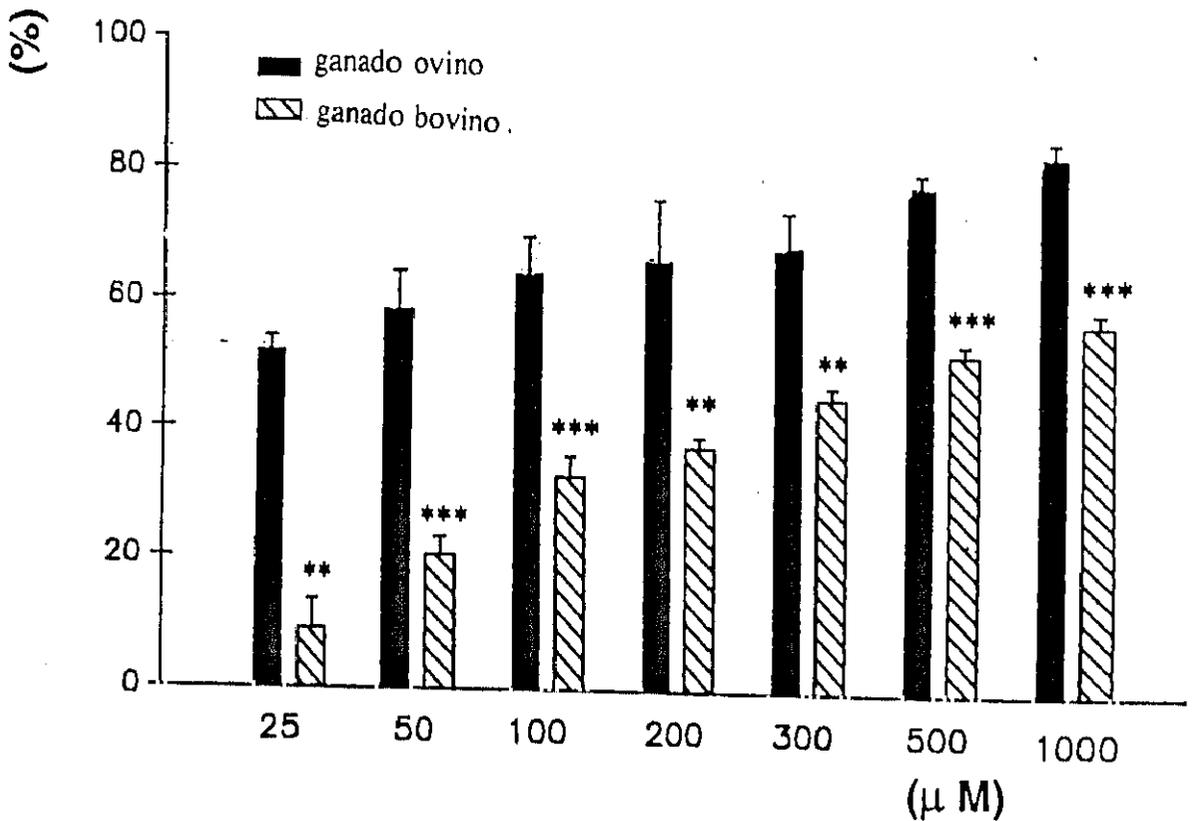


Figura C: Estudio comparativo de la inhibición del metabolismo del albendazol (ABZ), mediado por MTZ, en ganado ovino y bovino. Los puntos representados son los valores medios de 6-8 determinaciones. Los resultados fueron calculados como porcentaje de ABZSO formado en presencia de MTZ frente al control. Los valores obtenidos para ganado bovino son estadísticamente diferentes al porcentaje de inhibición obtenido en ganado ovino a  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*).

### 2.3. UTILIDADES VETERINARIAS DEL ALBENDAZOL.

Se ha demostrado que el tratamiento rutinario con albendazol, incluso en casos de parasitismo leve, proporciona ventajas económicas. De forma que el albendazol es de gran utilidad no solo en terapéutica, sino también en epidemiología por su amplia actividad que incluye nematodos extraintestinales y tenias (Campbell, 1990).  
Tabla 2.

Albendazol presenta un amplio margen de seguridad que comparte con otros benzimidazoles. Las vacas no deben ser tratadas durante el primer mes de gestación. En caso de ganado ovino, presenta una dosis mínima tóxica de mas de 10 veces la dosis terapéutica, para nematodos y mayor de 5 veces, para trematodos.

El período de sacrificio de los animales para el consumo humano varía desde 14 días en ganado vacuno, hasta 10 días en ganado ovino.

En el caso del tratamiento de helmintos de distintas especies de ganado, sobre todo ovinos y bovinos, se han desarrollado nuevos sistemas de administración, los cuales producen una mejora en la farmacocinética del fármaco, así como nuevas formulaciones de este.

### 3.1. Nuevos sistemas de administración

#### En ovinos

**Dispositivo andré-reticular de cesión continua de albendazol.** La cápsula administra aproximadamente 0,5 mg/kg durante 3 meses. Su administración a ovejas, comparado con la administración de 3,8 mg/kg de albendazol en "drench" mostró entre un 75 % y un 100 % de efectividad mayor frente a nematodos gastrointestinales (Dorchies y col., 1989).

Alzieu, 1990, administró este mismo sistema durante las épocas de cría de ovejas comprendido entre 1985 y 1989 y se comparó con el albendazol a la dosis de 3,8 mg/kg administrado en "drench", encontrando menor carga parasitaria con el primer sistema de administración a la vez que los corderos mostraron mejores canales.

Según Mage y Pothier, 1990, la administración de " Proftril" a ovejas, tres semanas antes del apareamiento de otoño, aumentó, o tuvo un efecto beneficioso en la fertilidad de las ovejas ( 121,1 % corderos nacidos, frente al 96,1 % del control tratados con tiabendazol a 70 mg/kg) junto con una reducción del contenido de huevos en heces.

La administración intraruminal de la cápsula de ABZ (proftil-Captec) a ovejas con infestación natural de nematodos intestinales y trematodos (*D. dentriticum*), demostró análisis coprológicos negativos 10 días, después de la administración de la cápsula; también se observó una disminución en la contaminación de pastos por larvas de nematodos y una ganancia de peso en los terneros (Corba, 1991, 1994)

Bell, 1992 demostró la eficacia de este sistema en la época de pastos, encontrando una reducción de formas parasitarias

#### **En bovinos:**

Barger, 1993 utilizó este sistema con ovejas merinas y terneros , en unos pastos donde los parásitos son benzimidazol-resistentes, comparando la eficacia de la administración de dos CRC (dispositivo andré-reticular de cesión continua de ABZ) con el mínimo tratamiento control y seguimiento del programa Wormkill. Encontró una disminución en la carga parasitaria a la vez que los lechales tratados con CRC perdieron menos peso y ganaron mas lana durante el período de lactancia.

También se han utilizado nuevos dispositivos de administración como profiláctico, para evitar la contaminación de terneros con helmintos presentes en los pastos. En este caso se administró un dispositivo de liberación controlada intermitente, el cual contenía tres dosis de ABZ liberadas en los días 31, 62 y 93 de pasto, mos-

trando una disminución en la carga parasitaria, así como una ganancia de peso y menor nivel de pepsinógeno en sangre. La contaminación de pastos con larvas de helmintos fue menor (Borgsteede y col., 1988). Este mismo efecto fue descrito por Lotze 1989, quien encontró casi un 100 % de eficacia, en la infestación por nematodos (100 % eficacia para *D. viviparus*), hasta el 4<sup>o</sup> mes después de la administración del albendazol.

### 3.2 Eficacia de nuevas formulaciones de albendazol

**Aldifal** ( suspensión de albendazol 2,5 %, hecho en Checoslovaquia) administrado a 2928 ovejas merinas, en dosis orales de 5 mg/kg a 10 mg/kg, resultó un 100 % eficaz frente a *Trichuris*, *Ostertagia*, *Nematodirus*, *Chabertia* y *Trichostrongylus* spp. Dosis de 7,5 mg/kg a 10 mg/kg fueron 100 % eficaces frente *Dictyocaulus filaria*, *Muellereius capillaris* y *Moniezia* spp. Contra estados juveniles de *Fasciola hepatica*, albendazol a 10 mg/kg, mostró una eficacia de un 97,7 %, cuando se administró dos veces en un intervalo de 48 horas; contra estados maduros de *F. hepatica*, la eficacia fue de 95,4 % . Albendazol, a la dosis de 10 mg/kg fue 95,9 % eficaz frente adultos de *Dicrocoelium dendriticum*. ( Corva y col., 1988)

**Vermitan** (suspensión 2,5 % albendazol de origen húngaro), administrado a la dosis de 5 mg/kg a corderos, fue eficaz contra *Moniezia* spp. y nematodos gastrointestinales (Schuster y Hiepe; 1987). Este mismo producto administrado a dosis de 7,5 y 10 mg/kg, produjo una reducción del 72,2 % y 87,5 % de *Dicrocoelium dendriticum*, alcanzándose porcentajes de reducción próximos al 100 % con dosis de 15 mg/kg ( Schuster y col., 1989).

En 1992 Corba comparó la eficacia de esta formulación con un dispositivo intraruminal (Proftril-Captec producido por SKF) a 300 ovejas (con una carga parasitaria en heces inferior a 30 huevos/g). Vermitan a la dosis de 7,5 mg/kg redujo el contenido de huevos en heces (< 4.4 huevos/g). Tres semanas después, a 100 de estas ovejas, se le administró un dispositivo intraruminal de albendazol en "bolus"; cinco meses después, las ovejas que recibieron el dispositivo tenían una

media de 8,4 huevos/g, comparado con los 33,9 huevos/g encontrados en los animales tratados solo con ivermectina.

La administración de Valbazen (SKF-ABZ), a las dosis de 15 mg/kg ( a terneros y búfalos) y de 7,5 mg/kg ( a cabras), produjo una reducción en el número de huevos de *Fasciola gigantica*, apreciándose una disminución en la sintomatología en el 7º día p.t. quince días después del tratamiento se registraron eficacias de 96,25, 97,06 y 96,18 %, contra formas adultas, en terneros, búfalos y cabras respectivamente. La administración de 7,5 mg/kg, produjo la eliminación total de *Moniezia* spp (Misra,S.C, y col.,1989, 1989b).

Corderos infestados naturalmente con helmintos gastrointestinales recibieron "bolus" conteniendo 600 mg de netobimin o una suspensión del mismo al 5 % .La dosis media administrada fue de 19,1 mg/kg y 18,4 mg/kg, respectivamente. En ambos tratamientos se encontró un 100 % de reducción de adultos de los helmintos gastrointestinales mas comunes; 99 % de reducción en larvas de tricostronglidos. Ambas formulaciones fueron moderadamente eficaces contra *Trichuris* spp. También se encontraron proglótides de *Moniezia* spp. en heces. No existió diferencia de eficacia entre las dos formulaciones.

Tabla 2. Eficacia del albendazol en el tratamiento de distintas parasitosis según el hospedador. Dosis orales salvo indicación.

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
<b>EFICACIA FRENTE A HELMINTOS DE GANADO OVINO</b>				
Cai, X.P., 1986	<i>F. hepatica</i> (adultos)	50 mg/kg en las semanas 3 <sup>a</sup> ; 5 <sup>a</sup> ; 7 <sup>a</sup> ; 9 <sup>a</sup> .	23,9 / 13,3 / 62 / 94,7 % reducción	albendazol manufacturado en China.
Sanz, F., 1986	<i>O. trifurcata</i> ; <i>O. ostertagi</i> ; <i>N. sphathiger</i> <i>M. marshalli</i> ; <i>H. contortus</i> ; <i>C. ovinata</i> <i>T. axey</i> ; <i>T. colubriformis</i> ; <i>D. filaria</i> <i>T. capricola</i> ; <i>N. filicollis</i> ; <i>LA Ostertagia</i> sp	7,5 mg/kg, en "drench"	100 99,9 <i>O. circumcinata</i> 97,9 <i>T. vitrinus</i>	Infestación natural Se administró Netobimin no se observaron efectos 2°.
Clarkson, 1986	Quistes hidatídicos pulmonares	10 mg/kg ó 20 mg/kg x 6 semanas	protoescolícos no viables membrana germinal destruida	infestación natural.
Niphadkar, 1986	<i>Haemonchus</i> , <i>Trichostrongylus</i> , <i>Oesophagostomum</i> , <i>Trichuris</i> spp	5 mg/kg 1, 2 ó 4ppm "in vitro"	no se encontraron huevos en heces inhibió la eclosión	
Schuster, R., 1987	<i>Moniezia</i> spp y estrostrongílicos intestinales	5 mg/kg en bebida	albendazol "vermitan" se administró en comparación con otras formulaciones de mebendazol (granulado, 10%), y Niclosamida (micronizada 100mg/kg). Albendazol y mebendazol eficaces en ambos casos, Niclosamida recomendada en <i>Moniezia</i> .	
Tinar, R., 1988	<i>Fasciola</i> spp y nematodos intestinales ( <i>H. contortus</i> , <i>Ostertagia</i> spp, <i>Trichostrongylus</i> , <i>Trichuris</i> spp. <i>Nematodirus</i> spp, <i>B. trigonocephalum</i> , <i>O. venulosum</i>	5 mg/kg; 2,5 mg/kg	<i>Fasciola</i> spp 71 y 60 % y nematodos gastrointestinales 99,96 % y 99,8 % respectivamente, la administración de "Okzan" (2,8 mg/k oxfendazol + 15 mg/k oxiclozanida) 97,33% <i>Fasciola</i> spp y 99,6 % , en nematodos gastrointestinales.	

Tabla 2 continuación...

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
Tinar.P; 1988	<i>Fasciola</i> y nematodos gastrointestinales	2,5 ; 5 y 10 mg/k	33, 47 y 100 %	frente a <i>Fasciola</i> y aprox 100 % frente a nematodos (examen de heces), resultó menos eficaz frente a <i>D.dentriticum</i> y <i>Paramphistomum spp.</i>
Kwan.L, 1988	aislamientos BZ-resistentes de <i>H.contortus</i> adultos de <i>Fasciola hepatica</i>	> 1 mg/k x 5 día intraruminal 4,5 mg/k x 5 días	100 % 100 %	la continua infusión de albendazol es mas eficaz que la administración de dosis únicas o regímenes diarios.
Corba.J, 1988	<i>Trichuris</i> , <i>Ostertagia</i> , <i>Nematodirus</i> <i>Trichostrongylus spp</i> , <i>Chabertia spp</i> <i>F.hepatica</i> .	Aldifal(2,5 % susp) de 5 a 10 mg/k	100 %	dosis de 10 mg/kg 2 veces en un intervalo de 48h igual de eficaz que dosis únicas frente a adultos de <i>F.hepatica</i> .
Dik.B, 1988	<i>Trichostrongylus</i> , <i>Nematodirus</i> , <i>Ostertagia</i> <i>Moniezia</i> ; <i>D.filaria</i>	3,8; 7,5 y 10 mg/kg	100 %	examen de heces en el día 11 p.t
Gates.N.L y Foreyt.W.J, 1990	nematodos gastrointestinales	10 mg/kg	100 %	examen de heces, parasitosis natural
Ahmad.M, 1990	nematodos gastrointestinales	5 mg/k (2,5 % susp ABZ)	100 %	eficaz frente a <i>Trichuris spp</i> (72 %)
Gundlach.J, 1990	nematodos gastrointestinales <i>Moniezia spp</i> <i>Fasciola hepatica</i>	7,5 mg/kg	98,6 % 81,3 % ineficaz	luxabendazol(10 mg/kg), 100 % en nematodos y <i>Moniezia spp</i> , ineficaz en <i>Eimeria spp</i> .
Bauer.C 1990	<i>Moniezia expansa</i>	3,8 mg/kg	90 % proglotides/heces 100 % eficacia ABZ y febantel (5 mg/kg) 90,9 % para oxfendazol (5mg/k) y (1° día p.t) Prazicuantel (3,8 mg/kg)	

Tabla 2 continuación...

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
Kerboeuf 1990	<i>T. circumcinata</i> , <i>T. colubriformis</i> <i>H. contortus</i>			ABZ y OXF, formas resistentes, sin embargo dos meses p.t apareció efecto ovicida. Netobimín 100 % eficacia frente a estos nematodos.
Lovw.J.P 1993	nematodos gastrointestinales	ABZ 3,8 mg/k; FBZ 10 mg/k IVM 0,2 mg/k; LEV HCl 7,5 ABZ 3,8 + Closantel sódico 6		Todos muy eficaces <i>H. contortus</i> , adultos y estados inmaduros <i>Theladorsagia</i> spp resistentes a ABZ y FBZ; inmaduros a ABZ/closantel. Adultos y formas inmaduras de <i>Nematodirus</i> ABZ/closantel ; adultos a FBZ.
<b>EFICACIA FRENTE A HELMINTOS DE GANADO BOVINO.</b>				
Genchi,C, 1986	nematodos gastrointestinales	7,5 mg/kg	huevos/heces disminuyeron 9% 15h p.t y 2 % 48 h p.t	fue activo frente a adultos.
Genchi,C, 1986b	estrongilidos intestinales	7,5 mg/kg	0% huevos en heces 24h p.t fuertemente ovicida	eficaz frente <i>Ostertagia</i> , <i>Cooperia</i> , <i>trichostrongylus</i> , <i>Nematodirus</i> spp.
Misra.S.C., 1989	<i>F. gigantea</i> .	15 mg/kg	en el día 7 p.i disminución nº huevos en heces ,15º día p.t 96,25 % reducción de adultos	administración de valbacen (SKF-ABZ)
Misra.SC, 1989b	<i>Moniezia</i> spp.	7,5 mg/kg	expulsión del gusano no huevos/heces 50 día p.t	Valbazen (SKF-ABZ)
Pinheiro,A.C 1990.	<i>T. axei</i> , <i>Ostertagia</i> <i>Cooperia</i> , <i>Haemonchus</i> spp.	5-7.5 mg/kg	90 % <i>T. axei</i> 81-88% <i>Haemonchus</i> spp.	oxfendazol 2,5 mg/k 60 % <i>Haemonchus</i> spp.

Tabla 2 continuación...

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
Williams, J.C 1991	L4 <i>O. ostertagi</i>	10 mg/kg FBZ y LEV tópico mismas dosis	99 % adultos, 95 % L4 84 % EL4, 98-100 % adultos y L4 <i>Haemonchus</i> , <i>T. axei</i> y <i>Cooperia</i> spp adultos.	ABZ y FBZ igual de eficaces. LEV < efica- cia.
Emiler, J	L4 <i>O. ostertagi</i>	ABZ 10 mg/kg; FBZ 10 OXF 4,5 mg/kg dosis recomendadas.	18-84 %; 65-97%; 33,5-93 % respectivamente. dosis menores 30-86 %; 0-97%; 0-85 % .dosis mayores 84% ; 92-99% ; 78-95 % .	
Waghmare, S.P 1991	<i>T. vitulorum</i> <i>S. papillosus</i>	7,5 mg/ml (25mg/ml)	disminución progresiva en el número de huevos, pero no eliminó totalmente la infección. El tratamiento con Ivomec (dosis 1% de ivermectina 200µg/k subcutan) resultó mas eficaz.	
Gundlach, J.L 1991	nematodos gastrointestinales <i>F. hepatica</i>	10 mg/kg	97 % frente a nematodos 68 % <i>F. hepatica</i>	aumento en hematocrito hemoglobina, disminución eosinófilos y leucocitos
Dorchies, P.H 1992	<i>F. hepatica</i>	10 mg/kg X 2 intervalo 2 meses	85 % p. 1º Tto 96,2 % p. 2º Tto	interés en el Tto inmedia- to tras volver al establo en invierno
Vassilewg, D 1993	nematodos gastrointestinales	7,5 mg/kg x 3 ó 0,2 IVM x 3 meses 10 y 11 ó IVM X2 meses 3 y 4	IVM x3 15,8 % > efecto que ABZ ó 43,5 % > que IVM x2. IVM efecto residual protector durante 2 ó 3 meses ABZ carece de este efecto .	

Tabla 2 continuación...

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
<b>EFICACIA FRENTE A HELMINTOS DE GANADO CAPRÍNO</b>				
Guha,C 1986	nematodos gastrointestinales	3,5 y 5 mg/kg	100% frente a nematodos ineficaz en <i>Trichuris</i> spp	Se administró albendazol comercial (analgon).
Guha,C 1987	nematodos gastrointestinales	3,5 mg/kg	100 % ineficaz <i>Trichuris</i> spp	tiofanato(100mg/k),levamisol(8mg/kg) tetramisol(35mg/k) eficacias:100, 93,4, 72,2 % .
Foreyt,W.J 1988	<i>Fasciola hepatica</i>	5, 7, 10, 15 mg/kg	73, 88, 88, 95,9 %	administración de 75 mg/kg no signos de toxicidad.
Pomroy,W.E 1988	nematodos gastrointestinales <i>Ostertagia,Trichostrongylus</i> spp <i>H. contortus,Cooperia</i> spp, <i>C.ovina</i>	3,8 mg x 2 (24 horas) 7,6 mg/kg x 1	> 99 % ambos regímenes	La dosis simple > 99% eficacia frente <i>O. venulosum</i> , mientras que dosis repetidas 96 %.
<b>EFICACIA FRENTE A HELMINTOS DE CERDOS</b>				
Theodrides,V.J Rew,R.S, 1988	<i>A. summ, Oesophagostomum</i> spp <i>Trichuris, Strongyloides</i> spp	2.5 mg/kg  10 mg/kg 10 pmm en comida x 5-10días 40 pmm	- > 95 % <i>Trichuris</i> spp, <i>A. summ</i> <i>Oesophagostomun</i> spp. - 97 % <i>Strongyloides</i> spp. - eficaz frente a <i>Oesophagostomun</i> spp, <i>A. summ</i> - eficaz frente a <i>Trichuris</i> spp.	
Juris,P 1990	<i>A. summ, Oesophagostomum</i> spp. <i>Strongyloides ramsoni</i> <i>Trichuris suis</i>	5 mg/kg	97,2-100 % 100 % 71,5-75 %	Se administró Vermitan premix 10%(bioveta,Nitra) formulación Checoslovaca

Tabla 2 continuación...

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
<b>EFICACIA FRENTE A HELMINTOS DE GANADO EQUINO</b>				
Madhav.A.B 1989.	infección mixta: <i>Ascaris</i> spp <i>Strongyloides</i> spp, <i>Trichuris</i> spp	5 mg/kg x 3 días fraccionado 2 tomas/día	elevada	Se observó un aumento de peso en el día 30 p.t. No efectos adversos.
<b>EFICACIA FRENTE A HELMINTOS DE PERROS</b>				
Holenweger.JA 1987	nematodos gastrointestinales	10, 20 y 30 mg/kg	dosis 30 mg/k 100 % dosis menores reducen carga parasitaria	
Holenweger.JA 1988	<i>Toxocara canis</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> <i>Dipylidium caninum</i> , <i>Trichuris vulpis</i>	30 mg/kg + 2,5 mg/kg de prazicuantel.	100 % en <i>T.canis</i> , <i>A.caninum</i> , <i>D.caninum</i> casi 100% <i>T.vulpis</i>	
Manuel,MF 1989	<i>Toxocara</i> spp , <i>Ancylostoma</i> spp	15 6 20 6 25 mg/kg x 3 días 20 6 25 mg/kg x 1 día	100 % 100 % <i>Toxocara</i> , 65 % y 72 % <i>Ancylostoma</i>	ABZ x 3 días graves efectos adversos dosis únicas no toxicidad
<b>EFICACIA FRENTE A HELMINTOS DE ROEDORES.</b>				
<b>1. Gerbo</b>				
Taylor.D.H 1989	<i>E.multilocularis</i> inyección intra- peritoneal	ABZ 50 mg/kg, MBZ 50 mg/kg PZQ 500 mg/kg	PZQ fue el mayor agente protoscolicida (< 2% viabilidad) aunque no inhibe el crecimiento del quiste, ABZ fue el mas eficaz en la reducción del crecimiento, siendo mas eficaz que MBZ 6	
PZQ. Taylor.D.H 1989b	<i>E.granulosus</i> inyección intra- peritoneal	ABZ 50 mg/kg x 1 mes PZQ 500 mg/kg x 1mes ABZ + PZQ x 1 dosis 24 h p.i intraperitoneal	8 meses después, reducción en el nº de quistes en todos los lotes tratados, > eficacia con la combinación de ambos fármacos.	

Tabla 2 continuación...

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
Taylor.D.H 1989c	<i>E.granulosus</i>	20 ó 50 mg/kg/día		la respuesta a la terapia y la viabilidad de los quistes dependen de las dosis y período tratamiento, dosis 50 mg/kgx2 meses efecto profiláctico hasta 3 meses después.
Morris,D.L 1990	<i>E.granulosus</i>	50 mg/kg	< n° quistes después 3 meses tratamiento	la incubación de los quistes tratados y control con ABZSO y posterior implantación a gerbiles. Formas resistentes (Tt° con ABZ)
Shen,Y 1994	hidatidosis alveolar	altas dosis de ABZ prazicuantel	33,3 % 25-16 %	* Gran infiltración de linfocitos en el grupo tratado con ABZ. * Combinación ABZ + PZQ menos eficaz.
<b>2. Ratones</b> Kulieva,N.S 1988	<i>H.nana</i>	0,1g/kg x5 días	97,31	MBZ 89,23; Medamin 87,1; FLBZ 65,88 a igual dosis se recomiendan en infecciones mixtas cestodos-nematodos.
Bhopale.G.M 1988	<i>A.caninum</i>	distintas dosis x 5 días (larvas establecidas cerebro)		ABZ,FLBZ mas activos. TBZ,Benacil,OXF,MBZ significativa actividad larvicida tetramisol,FBZ, Sch 18099,pamoato pirantel, moratel tartrato, pamoato de oxantel ineficaces utilizados a relativas altas dosis.
Hwang,K.P 1988	<i>A.cantonensis</i>	ABZ(Zentel) 5, 10,20 mg/kg empezando 5, 10 o 15 días p.i hasta los días 7, 14 ó 21 p.i		casi 100% en ratones tratados 14 días(comienzo 5-10 días p.i).Se encontró gusanos en ratones tratados 14 días(comienzo 15-20 días p.i) aunque menos que en control.Similar resultado Tt° 7 y 21 días. % reducción menor con dosis de 5 mg/k aunque no diferencias significativas en el Tt° con altas dosis.
Delgado.O. 1989	<i>Toxocara canis</i>	9 mg/kgx 8 días, 2 días p.i 3 mg/kg x 8 días (cada 8h)		En ambos caso reducción del n° larvas y motilidad en cerebro mayor eficacia en caso de dosis fraccionadas.

Tabla 2 continuación...

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
Cheetham, R.F 1991	<i>Capillaria hepatica</i>	30 mg/kg	> 90 % en la deposición de huevos	mismo efecto observado con: FBT 30mg, MBZ 3,13mg, OFZ 12,5 mg.
Rashid, V.M 1991	<i>Trichuris muris</i>	MBZ 5 ó 10 mg/g X 3 (juvenil) 10 mg/k X 3 ó 20 mg/k X 2(adultos)	100 % .	La eficacia de medamina y albendazol es < y depende directamente de dosis, período Tt°, fraccionamiento dosis.
Samanta, S 1990	<i>Toxocara muris</i>	100 mg/kg 24h p.i X 1 semana	n° de larvas recuperadas por digestión, fue signif < que en control = resultado con FBZ 100 mg, IV 0,2 mg subcutanea, menor resultado con TBZ 150 mg.	
McCracken, R.O 1992	<i>H. microstoma</i> <i>H. diminuta</i>	50 mg/kg x 1, día 27 p.i 50 mg/kg x 3 días	inactivo 50 %	MBZ a estas dosis resultó ineficaz, esto coincide con el efecto de estos fármacos el modelo <i>H. diminuta/rata</i> .
Hrckova, G 1993	<i>T. spiralis</i> (muscular)	10 mg/kg, x 3 diarias 10 mg/kg x 6 diarias (ambas en liposomas)	5 % 38 %	Las mismas dosis administradas semanalmente resultaron ineficaces, cuando se administró con intervalos 6 semanas 5 % reducción en el n° larvas.
Hrckova, G 1994.	<i>Mesocestoides corti</i> <i>tetrathyridia</i>	liposomas ABZ x 3 (i.p) vs doble de concentración de ABZ libre (oral).		misma eficacia antiparasitaria con ambos tratamientos
Xiao, S 1994.	<i>Ancylostoma caninum</i>	75, 150 mg/kg (i.g) 300 mg/kg x 3	98,6 % 99,02 %	concentraciones plasmáticas de ABZ inapreciables. Altas concentraciones de ABZSO en plasma y músculo
<b>3. Ratas</b>				
Amato Neto, V 1986	<i>S. venezuelensis</i>	5; 6,75; 12,5; 25; 50 mg/kg	100% dosis > 5mg a 5 mg = 87 %	eficacia de MBZ Y CBZ = 80 y 98 % respectivamente utilizados a dosis 5 mg. 100% con dosis superiores.

Tabla 2 continuación...

AUTOR	PARASITO	POSOLOGIA	EFICACIA	OBSERVACIONES
Mojon,M 1987	<i>Strongyloides</i> spp	50 mg/k días 1,2,3 p.i 4,5, 6 p.i + esteróides	33 % n° huevos 95,5% carga parasit 100%	Tt° mas tempranos o 150mg/kg 3h a.i y 3h p.i; no eficaz. TBZ 50mg/kg días 4,5,6 p.i 100% eficacia Tt° 12h a.i ó 6, 24h p.i ineficaz Ambos Tt° ineficaces fase tisular infección
Galal,M 1987	<i>H.diminuta</i>	267mg/kg x3 y 800mg/kg 30 días p.i	100 % .no diferen- cias entre Tt°	MBZ 500mg/kg y 167mg/kg x 3. Parcialmente eficaz 76%. PZQ 250mg/k y 83 mg/k x3 100% .
Tang,Y.H 1988	<i>Clonorchis sinensis</i>	150 mg/kg	hinchazón y protusión y erosión del tegumento a las 24, 36, y 48 h p.i	PZQ 300 mg/kg 2h, 4-24h y 36-48h = efecto.
4. Conejos Jiang,J.S 1988	<i>S.papillosus</i>	40 mg/kg	100%	TBZ 200 mg/kg 99,99% ; MBZ 30 mg/kg 99,88% LEV 20 mg/kg 75,54 %. Adultos en duodeno yeyuno > ileon.



## 2.4. ALBENDAZOL EN LA QUIMIOTERAPEUTICA HUMANA.

En las pasadas dos décadas se ha conseguido un extraordinario avance en la quimioterapia antihelmíntica, sin embargo no se ha encontrado un tratamiento satisfactorio para oncocercosis, cisticercosis o equinococosis. Además es necesario el desarrollo de un antihelmíntico de amplio espectro, efectivo a dosis únicas, en el tratamiento de las cuatro infestaciones por los nematodos intestinales mas importantes: ascariosis, trichurosis, strongyloidosis y ancilostomosis. Ivermectina parece ser un avance en el tratamiento de la oncocercosis; mebendazol y albendazol, de primera línea, en el tratamiento de la equinococosis; y prazicuantel, en el tratamiento de clonorquiosis y opistorquiosis. Albendazol es considerado de amplio espectro contra nematodos intestinales, mientras que prazicuantel lo sería en infestaciones producidas por cestodos y trematodos.

En la tabla siguiente, se refleja el tratamiento de la mayoría de helmintosis humanas, se incluyen también fármacos alternativos.

Tabla 3

PARASITO	FARMACO	ALTERNATIVAS
<b>NEMATODOS</b>		
<i>A. lumbricoides</i>	pamoato de pirantel	piperazina, mebendazol, levamisol bephenium o albendazol
<i>T. trichiura</i>	mebendazol	oxantel-pamoato pirantel o albendazol
<i>N. americanus</i>	pamoato de pirantel mebendazol	Bephenium, tetracloroetileno, levamisol o albendazol.
<i>A. duodenale</i> infección combinada <i>Ascaris, Trichuris</i>	mebendazol o pamoato de pirantel	albendazol
<i>A. duodenale</i> infección combinada <i>Ascaris, y Tenias.</i>	mebendazol o oxantel- pirantel pamoato	Bephenium o albendazol
<i>S. stercoralis.</i>	tiabendazol	albendazol, mebendazol, cambendazol

Tabla 3 continuación...

PARASITO	FARMACO	ALTERNATIVAS
<i>E. vermicularis</i>	mebendazol o pirantelpamoato	pamoato de pirvinium o albendazol
<i>T. spiralis</i>	ACTH, corticoesteroides tiabendazol, mebendazol	albendazol
<i>Trichostrongylus</i> spp	pamoato de pirantel o mebendazol	bephenium o levamisol
Larva migrans cutánea	tiabendazol	dietilcarbamicina o albendazol
Larva migrans viceral	tiabendazol, mebendazol	dietilcarbamicina
<i>A. cantonensis</i>	levamisol	ninguno
<i>W. bancrofti</i> <i>B. malayi</i>	dietilcarbamicina	ninguno
<i>Loa loa</i> <i>O. volvulus</i>	ivermectina	dietilcarbamicina mas suramina
<i>D. medinensis</i>	metronidazol	tiabendazol o mebendazol
capilariosis intestinal.	mebendazol	tiabendazol
<b>TREMATODOS</b>		
<i>S. haematobium</i>	prazicuantel	metrifonato
<i>S. mansoni</i>	prazicuantel	oxamniquina
<i>S. japonicum</i>	prazicuantel	
<i>Opisthorchis</i> spp <i>P. westermani</i>	prazicuantel	bithionol
<i>F. hepatica</i>	bithionol	emetina, dihidroemetina o prazicuantel
<i>F. buski</i>	prazicuantel, niclosamida	diclorofen, tetracloroetileno, bephenium

Tabla 3 continuación...

PARASITO	FARMACO	ALTERNATIVAS
<i>H. heterophyes</i> y <i>M. yokogawai</i> .	prazicuantel o niclosamida	bephenium, tetracloroetileno
<b>CESTODOS</b>		
<i>T. saginata</i>	niclosamida	prazicuantel, diclorofen, paramomicina, mebendazol.
<i>D. latum</i>	niclosamida	prazicuantel, diclorofen, paramomicina
<i>T. solium</i>	niclosamida	prazicuantel o mebendazol
Cisticercosis	prazicuantel	albendazol
<i>H. nana</i>	prazicuantel	niclosamida, paramomicina
<i>H. diminuta</i>	niclosamida	prazicuantel
<i>E. granulosus</i>	albendazol	mebendazol
<i>E. multilocularis</i>		

Sin embargo, el agente antihelmíntico de amplio espectro más efectivo, es el albendazol (Ramalingam, 1983), el cual se caracteriza por una rápida absorción (comparada con otros benzimidazoles) alcanzando altas concentraciones en tejidos, incluso cuando se administra a dosis relativamente bajas. Desde su aparición ha sido objeto de un gran número de ensayos clínicos (Colaud, 1984).

En la actualidad este fármaco está siendo utilizado en el tratamiento antimicrosporidios (infecciones oportunistas en pacientes de SIDA) (Haque, 1993; Dieterich, 1994; Weber, 1993 y Curry 1993).

El albendazol se encuentra disponible en el mercado en forma de comprimidos de 200 mg y en suspensiones con un contenido de 100 mg de albendazol en 5 ml. No muestra efectos secundarios graves cuando se administra en períodos de 1-3 días,

aunque existen casos de dolor epigástrico, diarrea, dolor de cabeza, náuseas, insomnio, vértigo y cansancio.

Los tratamientos prolongados en caso de hidatidosis y neurocisticercosis raramente van acompañados de fiebre, leucopenia reversible, alopecia (Toma, 1993), altas concentraciones de transaminasas y hepatotoxicidad.

La seguridad de este fármaco aún no ha sido establecida en niños y está contraindicado su uso en embarazadas, debido a los datos obtenidos de teratogeneidad y mutagenicidad (Cook, 1993). Así mismo, debe ser utilizado con precaución en casos de cirrosis hepática.

En la mayoría de los ensayos clínicos, la velocidad de cura fue mayor tras el tratamiento con albendazol, que con mebendazol incluso utilizando dosis menores (400 mg frente a 600 mg), en caso de infestación por *N.americanus* (Nontasut.P, 1989).

Las infestaciones producidas por *A.lumbricoides*, *A.duodenale*, *N.americanus* responden rápidamente. La administración de 400 mg en tabletas a adultos y en suspensión a niños mayores de 2 años, produjo un índice de curación del 50% en infestaciones por *H.Nana*; 100% por *A. lumbricoides*; 93,3 % por *A. duodenale* y 100% por *E. vermicularis*. Además se eliminaron síntomas como, diarrea, así como también se observó una disminución de vómitos, dolores abdominales y síntomas alérgicos (Al-Issa, 1985). Amato Neto, 1990, tras tratar a humanos parasitados con *H.nana* con 400 mg de albendazol durante 3 días, repitiendo el tratamiento 10 días después, encontró que 27 de 30 pacientes tratados seguían infestados.

Respecto a helmintosis mixtas (*Trichuris spp*, *A.lumbricoides*, *N.americanus*, *Strongyloides spp.*) en niños, la administración de 200 mg de albendazol mostró una gran eficacia (100% *A.lumbricoides* y *N.americanus*, 83 % *Trichuris spp*, 66% *H.nana*) en un corto espacio de tiempo (7-14 días); además esta dosis no produce efectos indeseables.(Pamba, 1987, 1989). Estas eficacias fueron similares a las descritas por Gazder, 1987, frente a *Trichuris spp* (91 %) y *Ascaris spp* (95 %).

Posteriormente Chiens, 1989; Hall, 1991, comprobaron que la administración de dosis únicas de 400 mg a adultos, resultaba poco útil para el control de infestaciones mixtas, donde *Trichuris* spp prevalecía. Sin embargo, Rajeswari y col., 1994, al administrar esta misma dosis a niños, observaron eficacias próximas a 100 % frente a *Ascaris* spp., mientras que frente a *Trichuris* spp, la eficacia quedaba reducida a un 39 %.

Adams y col., 1994, recomiendan el tratamiento de niños infestados por helmintos intestinales con albendazol, por mejorar el crecimiento, el apetito y la actividad física espontánea. Simeon y col., 1995, observaron escaso beneficio en la cognición, en niños infestados con *T.trichiura*, sin problemas de nutrición, obteniendo mejores resultados en niños malnutridos.

También ha sido utilizado con éxito, albendazol en combinación con mebendazol (300mg y 375 mg respectivamente), en el tratamiento de infestaciones por nematodos intestinales, obteniendo unas actividades de 98,8 %, en el tercer día de tratamiento frente a *Ascaris* spp. y 100 % frente a *Trichuris* spp y *Ancylostoma* spp, en el quinto día postratamiento (Yang, 1994).

Una de las infestaciones intestinales por nematodos de mas difícil tratamiento es la producida por *S.stercolaris*, puesto que presenta un ciclo de autoinfestación endógena. La terapéutica de este nematodo se realiza en dos niveles; primero en el lumen intestinal donde el parásito produce el síndrome de malabsorción intestinal, y segundo, en caso del síndrome de hiper-infestación, en casos de individuos inmunosuprimidos, generalmente (Zavala, 1994).

Actualmente se está utilizando el albendazol como agente quimioterapéutico frente a strongiloidosis (Cook, 1989; Ramalingam, 1983; Colaud, 1984), puesto que sus efectos secundarios son mínimos, además con tratamientos de 400mg de 2 a 3 días, en intervalos de una semana, se consigue el 100 % de curación (Pungpak, 1987; Vazquez, 1988; Chanthavanich, 1989). Otro de los benzimidazoles utilizados con éxito frente a este nematodo, es el cambendazol (Grove, 1989).

En la tabla siguiente se describe la dosificación empleada para el tratamiento de las principales helmintosis humanas:

<b>Nematodos intestinales</b>	400 mg diarios (1-2 días)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	400 mg diarios (3 días)
síndrome de hiperinfestación	400 mg diarios (15 días)
<i>Capillaria philippinensis</i>	400 mg diarios (10 días)
<b>Nematodos sistémicos</b>	200 mg 2 veces al día (10-20 días)
<b>Cestodos sistémicos</b>	
<i>Echinococcus</i> spp	400 mg diarios (28 días)
Neurocisticercosis ( <i>T.solium</i> .)	15 mg/kg diarios (30 días).

Las infestaciones por larvas migratorias cutáneas y viscerales son tratadas con albendazol (Wolf, 1993; Caumes, 1993). En el caso de Toxocariosis, se recomienda albendazol a una dosis mínima de 10 mg/kg durante 5 días, observándose una disminución en el número de eosinófilos e índices de curación mayores que, tras el tratamiento con tiabendazol (25 mg, en dos tomas diarias, durante 5 días) (Sturcher, 1989).

Respecto a infestaciones producidas por *Taenia* spp, los benzimidazoles son, en la actualidad el tratamiento aconsejado, aunque su eficacia es cuestionada, debido sobre todo, a la difícil identificación de la especie (Fran, 1986). Kaminsky, 1991, recomienda albendazol por su buena tolerancia. Sin embargo Chung, 1991, describe una pobre eficacia en el tratamiento de tenias humanas con albendazol (tras la administración de 800 mg durante 3 días, 1200 mg durante 2 días ó 1200mg durante 3 días, obtiene un 50% de curación; 14,3 % con 800 mg durante 2 días y 0 % con 400 mg y 800 mg, en dosis únicas).

Otro de los campos, dentro de la terapia antihelmíntica, donde el albendazol está siendo utilizado como fármaco promesa es en las infestaciones sistémicas por cestodos, sobre todo en el caso de hidatidosis y cisticercosis.

Estas dos helmintosis presentan la característica común de causar lesiones derivadas de una ocupación espacial. En la hidatidosis, el órgano mas afectado es el hígado, mientras que en la cisticercosis, es el sistema nerviosos central. Hace una década, el único tratamiento para la hidatidosis recomendado era la cirugía, presentando un 10 % de mortalidad y una elevada recurrencia.

El primer benzimidazol utilizado en hidatidosis fue el mebendazol, con dosis de 50 mg/kg diarios durante 3 meses. Esta dosificación era necesaria debido a la baja absorción oral de éste. Este problema se intentó eliminar administrando mebendazol junto a fosfatidilcolina (fosfolípido)(Lur'e, 1986) produciendo un aumento en la biodisponibilidad, ABC y  $T_{1/2}$ . Sin embargo, la eficacia del mebendazol administrado intramuscularmente no era modificada, aunque reducía uno de los efectos producidos por esta vía de administración, es decir, la acumulación en tejidos. Otros inconvenientes del tratamiento con mebendazol era los efectos secundarios producidos, tan graves como agranulocitosis, reacciones anafilácticas y glomerulonefritis, así como su errática biodisponibilidad.

Todos estos problemas hicieron pensar en una terapia alternativa: el albendazol, cuyo metabolito activo difunde libremente a través de la membrana quística, alcanzando una concentración efectiva en el fluido quístico y en el interior del quiste en general.

Aunque la eficacia del albendazol en hidatidosis no está demasiado clara, debido a la falta de estudios dirigidos hacia la determinación del estado del parásito una vez concluida la terapia, Gil Grande y col., 1993, aconsejan como tratamiento inicial el uso de albendazol, a la dosis de 10 mg/kg diaria, por un período de tres meses, como alternativa a la cirugía en casos de hidatidosis hepática no complicada. A este efecto Castellano y col., 1994, observan que la administración de albendazol en el período prequirúrgico, previene la difusión intra-abdominal del parásito.

"*In vitro*", ABZ, ABZSO y su combinación han demostrado tener actividad parasitostática frente a *E. granulosus*. Albendazol y su metabolito activo demostraron actividad protoscolicida después de un período de incubación de 30 días, mientras que con la terapia combinada este tiempo se redujo a 12 días. Además no se produjo

desarrollo de quistes tras la administración a ratones (Pérez serrano.J, 1994). Xiao y col., 1994, en un ensayo comparativo de la eficacia de ABZ, ABZSO y MBZ frente a ratones infestados con *E.granulosus*, describieron una baja capacidad protoscolicida "in vitro" para MBZ y ABZ. Por el contrario "in vivo" MBZ si mostró actividad, así como una relación entre el contenido de MBZ quístico y la actividad protoscolicida mayor que en el caso del albendazol. La quimioterapia experimental demuestra que ABZSO es metabolito mayoritario del ABZ y la dosis eficaz es la mitad del compuesto nativo (Xiao y col,1994).

La farmacocinética del albendazol y su metabolito activo ha sido descrita tras administrar 200 mg de albendazol a pacientes con *E.multilocularis* y *E.granulosus*, algunos de estos paciente presentaban obstrucción hepática. En estos se observó un incremento en las concentraciones plasmáticas, así como se prolongaron las constantes de absorción y eliminación. Albendazol resultó mas activo que mebendazol (Ellis, 1992); con eficacias del 50 % frente al 11 %, (Sato, 1994 ), debido a que el metabolito activo "ABZSO" alcanza una concentración intraquística 5 veces superior a la plasmática (Cotting, 1989), hecho atribuible a una mejor absorción y a un extenso efecto de metabolismo hepático a ABZSO, el cual hace imposible detectar niveles séricos de ABZ. Se han realizado estudios sobre la influencia del proceso de autoinducción enzimática por parte del albendazol en el primer paso de activación a albendazol sulfóxido (Steiger, 1990), encontrando una disminución en los niveles plasmáticos de ABZSO, en la mitad del segundo ciclo (administración de 200 mg por tres días, en ciclos de 4 semanas, con períodos de descanso de 14 días), también se observó un aumento en las transaminasas así como hepatotoxicidad, neutropenia y alopecia, recomendandose la monitorización de los pacientes.

Existen referencias bibliográficas del tratamiento de las infestaciones por *E.granulosus* y *E.multilocularis* con albendazol 800 mg/día, en ciclos de 24 días, con períodos de descanso de 14 días, presentando mejores resultados en caso de *E.granulosus* (Horton, 1989). Seville, 1989, recomienda, coincidiendo con Smith Kline and French, la dosis diaria de 800 mg (12 mg/kg/día para individuos con un peso menor de 60 Kg),dividido en dos tomas de 400 mg durante las comidas, en un total de 28 días. Pudiendo repetir la terapia durante 3 ciclos, con períodos de descanso entre ciclo de 14 días mínimo.

Actualmente se está recurriendo a la terapia combinada o utilización de formulaciones que han mejorado las características del producto de partida, intentando mejorar la farmacocinética de los fármacos en el organismo, acortar la duración de los tratamientos y aumentar el índice de curaciones en el menor tiempo posible. Así Al-karawi, 1992; Yasawy, 1993, recomiendan praziquantel mas albendazol; Yuhiro Chiba, 1991, la utilización de una dispersión sólida de mebendazol / polietileno-glicol (PEG-600); New, 1994, liposomas de albendazol; Wen, 1994, administra albendazol mas cimetidina en dosis de 20 mg/kg/día y 10 mg/kg/día respectivamente, durante 3 ó 4 semanas, encontrando un aumento en las concentraciones ABZSO biliares y en fluidos quísticos, así como una mejor tolerancia de los pacientes a la terapia. Rodriguez y col., 1995 administran intravenosamente nanopartículas conteniendo albendazol a ratones infestados con *E. multilocularis*, a la dosis de 6 mg/kg, encontrando una actividad antiparasitaria equivalente a la administración oral de 1500mg/kg de albendazol libre, sin toxicidad manifiesta para el hospedador. Este resultado es similar al obtenido por Wen y col., 1993, al administrar liposomas de albendazol a ratas infestadas con *E. multilocularis*, aunque la dosis administrada fue superior. Esta disminución en la dosis resulta interesante si tenemos en cuenta que la terapia con albendazol en humanos produce efectos secundarios en un 20% de los pacientes (Wen y col., 1994).

Respecto a la hidatidosis cerebral existen datos esperanzadores (Todorov, 1988; Liu, 1993; Moskopp, 1993; Qui, M.D, 1994), aunque los mejores resultados se obtienen en infestaciones pulmonares (debido a la delgada membrana quística). Sin embargo, los quistes hepáticos y localizaciones óseas responden peor al tratamiento.

Es importante también, indicar el efecto beneficioso del tratamiento con albendazol en el período prequirúrgico (10 mg diarios, durante un mes, produce la destrucción de la mayoría de protoescoles) (Horton, 1989) y en período postquirúrgico (10 mg/kg, en un período variable de 2 a 5 meses, previene recurrencias) (Golematis, 1989).

Por último, añadir la recomendación de utilizar albendazol en el tratamiento de neurocisticercosis, sobre todo en aquellos casos en los que praziquantel resulta ineficaz (Sotelo, 1990; Quintero-Rodriguez, 1988), Sanchez, 1993; Kapil, 1993; Medina, 1993; Monteiro, 1993; Mukherjee, 1993; Del-Brutto, 1992, 1993, 1994; Botero, 1993, Chotmongkol, 1993; Dharnadhark, 1993; Bauer, 1994, recomiendan el uso de albendazol junto a fenitoina (anticonvulsivante); Ferreira, 1994; Suri 1994).



## **MATERIAL Y TECNICAS UTILIZADAS**



### 3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales de experimentación utilizados han sido ratones de la estirpe SWISS CD-1 ( Charles River, España), indistintamente machos y hembras, dado el elevado número de animales necesario para las experiencias, aunque se seleccionan siempre animales de características uniformes para constituir los distintos lotes experimentales, la edad aproximada es de 30-40 días y su peso medio es aproximadamente de 30-35 g.

Los animales se disponían en jaulas de tamaño adecuado, y se mantenían en el animalario a temperatura constante de 20-25°C, suministrándoles agua y comida *ad libitum* durante todo el período de experimentación.

### 3.2. PARÁSITO.

Trichinella spiralis cepa GM-1.

Fue aislada de un gato montés (*Felis sylvestris*), capturado en Asturias en 1963 y mantenido desde entonces en el laboratorio mediante pases periódicos por rata y ratón. La comprobación de los caracteres específicos de la cepa GM-1 fue realizada por BOEV en 1978 en el Instituto Helminológico de Alma-Ata(URSS) mediante pruebas de entrecruzamiento con el aislamiento estándar de T. spiralis. Posteriormente ha sido caracterizada isoenzimáticamente por Pozio en 1992 como T. spiralis, aislamiento MFEL/ES/S2 GM-1 ISS48, encontrándose actualmente en el centro de Referencia de Trichinella (Instituto Superior de Sanidad de Roma), Italia.

### 3.3 FÁRMACOS ENSAYADOS.

#### 3.3.1. Fármacos de referencia.

- Albendazol (GEN-ABZ), suministrado por Chemo Ibérica s.a.
- Albendazol (GEN<sup>o</sup>-ABZ), suministrado por Chemo Ibérica s.a.
- Albendazol (SKF-ABZ), suministrado por Smithkline Beecham Pharmaceutical.
- Ricobendazol (RBZ), suministrado por Robert Young and Co.
- Ricobendazol (RBZ<sup>o</sup>), suministrado por Chemo Ibérica s.a.

#### 3.3.2 Nuevas formulaciones.

##### Dispersiones sólidas:

Usando como vehículo una polivinilpirrolidona (Kollindón 12 pf), Basf, han realizado dispersiones sólidas de los fármacos anteriores, obteniendo:

- Dispersión sólida de albendazol genérico (DsGEN-ABZ)
- Dispersión sólida albendazol patrón (DsSKF-ABZ)
- Dispersión sólida ricobendazol (Ds-RBZ)

Todas ellas realizadas y caracterizadas en el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica, por Dña Susana Torrado Durá Facultad de Farmacia. U.C.M.

##### Soluciones líquidas:

Se han realizado soluciones líquidas de los fármacos de referencia utilizando como vehículo Transcutol<sup>®</sup>(etoxidiglicol(nombre CTFA) suministrado por Gattefosse a Ph 1,2 obteniendo así:

- Solución líquida de albendazol genérico (S1GEN-ABZ).
- Solución líquida de albendazol patrón (S1SKF-ABZ).
- Solución líquida de ricobendazol (S1-RBZ).

### 3.3.3 Inhibidores metabólicos.

- Metimazol<sup>R</sup> (2-mercapto-1-metilimidazol) "MTZ" suministrado por SIGMA s.a.
- Metirapona<sup>R</sup> (2-metil-1,2-di-3-piridil-1-propanona) "MTP" suministrado por SIGMA s.a.

### 3.3.4 Otros.

- Neguvón<sup>R</sup> (éster dimetílico del ácido (2,2,2-tricloro-1-hidroxietil)-fosfórico, suministrado por Bayer s.a.
- Sulfato de atropina, de la casa comercial Bayer s.a.
- Sulfona del albendazol patrón (ABZSO<sub>2</sub>) suministrado por SmithKline Beecham Pharmaceuticals.



## **4.1. METODOS ANALÍTICOS DEL ALBENDAZOL.**

Las condiciones de estudio se han mostrado totalmente en la tesis doctoral "Estudio farmacéutico de nuevas formulaciones galénicas de albendazol", realizada por Dña Susana Torrado Durán.

Se han seleccionado algunas de las técnicas, a modo de resumen, que puedan aclarar o aportar alguna ayuda al desarrollo e interpretación de esta tesis.

### **4.1.1 HPLC.**

#### **4.1.1.1 Análisis de materia prima.**

Para determinar la riqueza del albendazol suministrado por Chemo Ibérica s.a, se tomó como patrón, el suministrado por Smithkline Beecham Pharmaceuticals.

El valor medio de riqueza obtenido fue de 92,5 % y la desviación estándar de 7,2 % (n=3).

En la figura 6 se representa el cromatograma de albendazol genérico (b) y albendazol patrón (a).

Se comprobó que aunque ambos coincidían en el tiempo de retención del pico mayoritario, el genérico presenta restos de un posible producto de degradación o impureza.

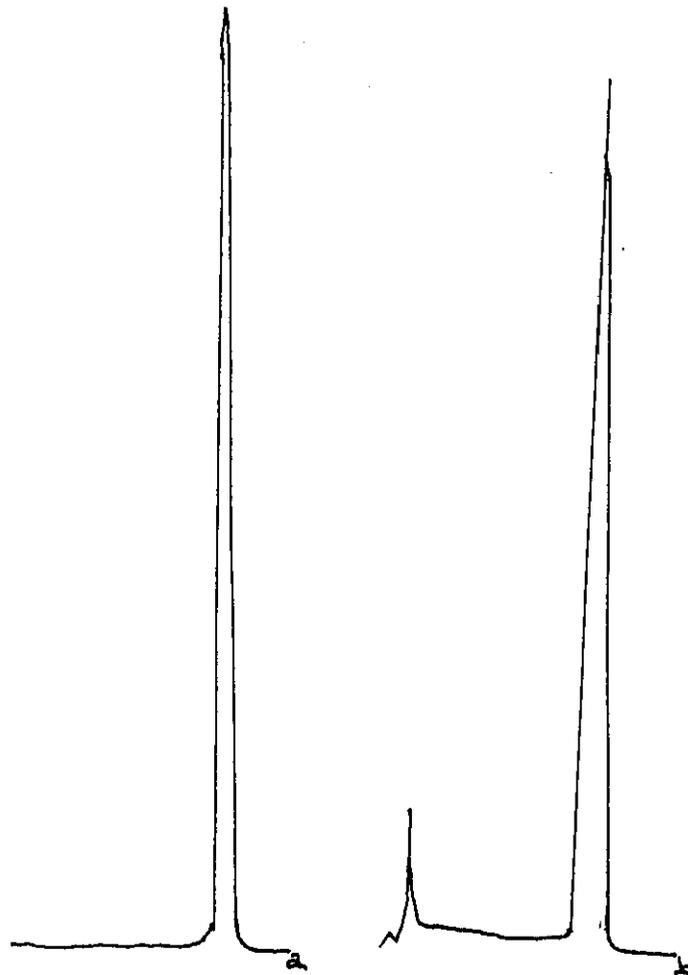


Figura 6. Cromatogramas del albendazol patrón "SKF-ABZ" (a) y genérico "GEI ABZ" (b)

#### 4.1.1.2 Método de determinación de albendazol y ricobendazol en muestras biológicas.

##### Condiciones cromatográficas

- Columna C18 Lichrosorb RP18, 10µm 200X4,6mm.
- Fase móvil: Flujo: 1ml/min  
Composición : Metanol:Agua(60:40/v/v)
- Volumen de inyección: 20 µl
- Detector 291 nm
- Sensibilidad 0,025
- Integrador: Atenuación .4  
velocidad de papel 0,25 cm/min  
Tiempo de análisis 7 min

Las figura 7 muestran el cromatograma típico de ricobendazol y albendazol con tiempos de retención 4,46 y 13,68 respectivamente.

#### 4.1.2. Difracción de rayos X.

Se recurre a esta técnica para comprobar la estructura cristalina de las dos muestras de albendazol de la cuales se dispone.

Para este estudio se utilizó un difractómetro SIEMENS con un intervalo de 20 desde 5 a 7° y con una intensidad de 1000.

El espectro de difracción de RX del SKF-ABZ y GEN-ABZ se muestran en la figura 8. Las diferencias mas importantes se muestran señaladas con flechas.

Se concluye que existe un peor grado de cristalización en el albendazol suministrado por Chemo Ibérica s.a.

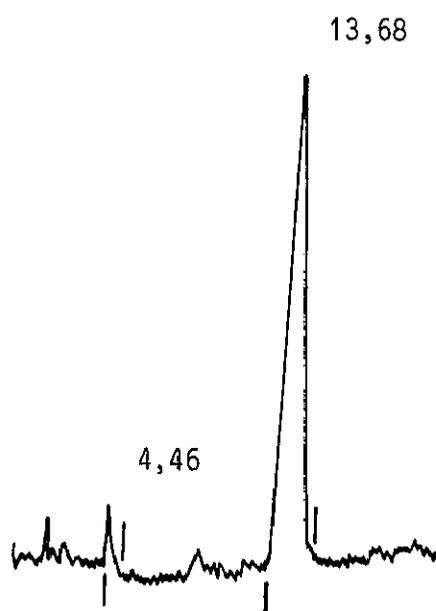


Figura 7. Cromatograma típico del ricobendazol (tr 4,46) y del albendazol (tr 13,68).

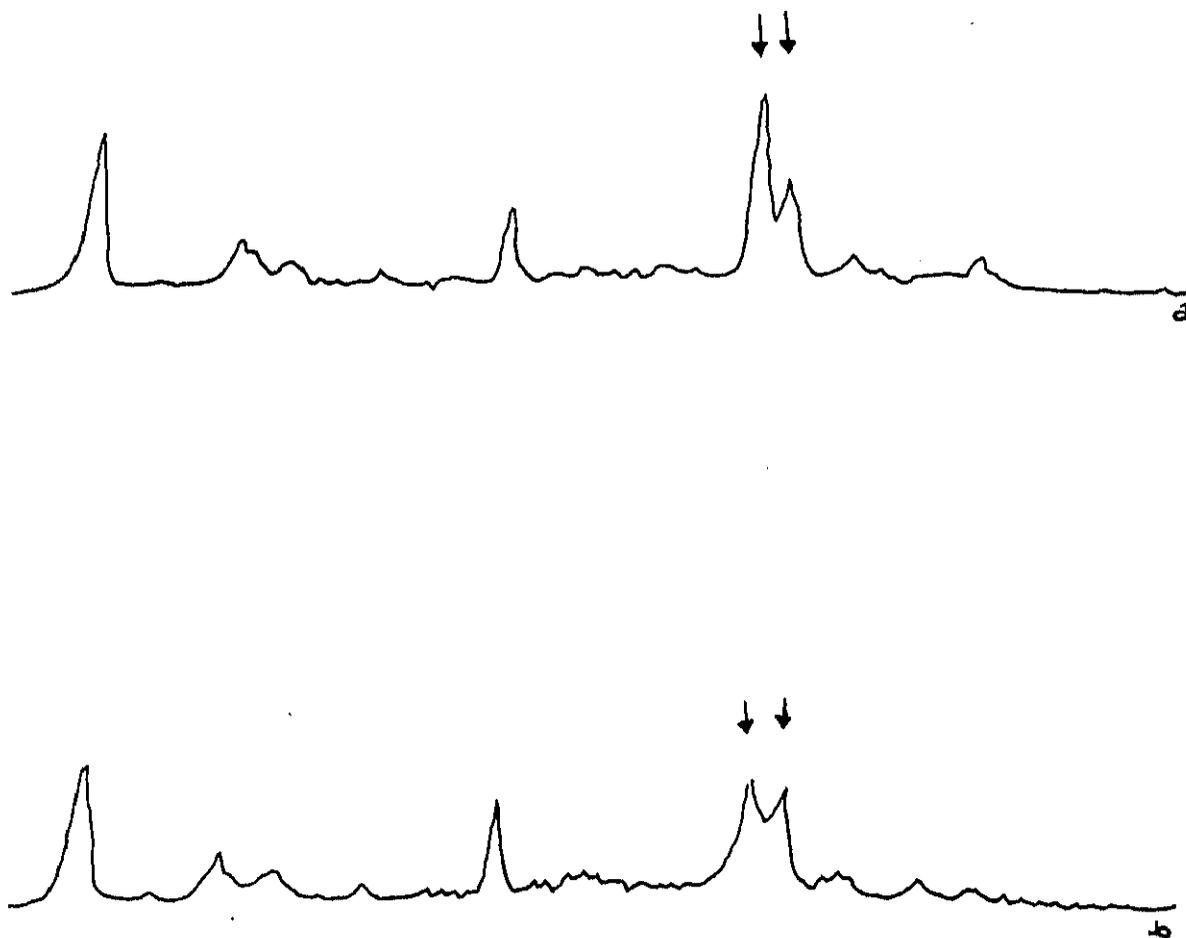


Figura 8. Espectro de difracción de RX del albendazol patrón "SKF-ABZ" (a) y genérico "GEN-ABZ" (b)

#### 4.1.3. Calorimetría diferencial de barrido.

El barrido calorimétrico diferencial se realiza mediante un equipo METALLER 6000.

Se estudian los termogramas de las dos muestras de albendazol; - SKF-ABZ presenta un doble pico de fusión (198 y 208 °C), mientras que GEN-ABZ presenta un pico simple (195 °C).

Los resultados se muestran en la figura 9.

La presencia de picos endotérmicos (hombro en el pico endotérmico del albendazol corresponde a la T' Fusión) puede justificarse por la existencia de anisótrapos, polimorfos, isómeros ópticos, productos de degradación, o a un intermedio de su síntesis.

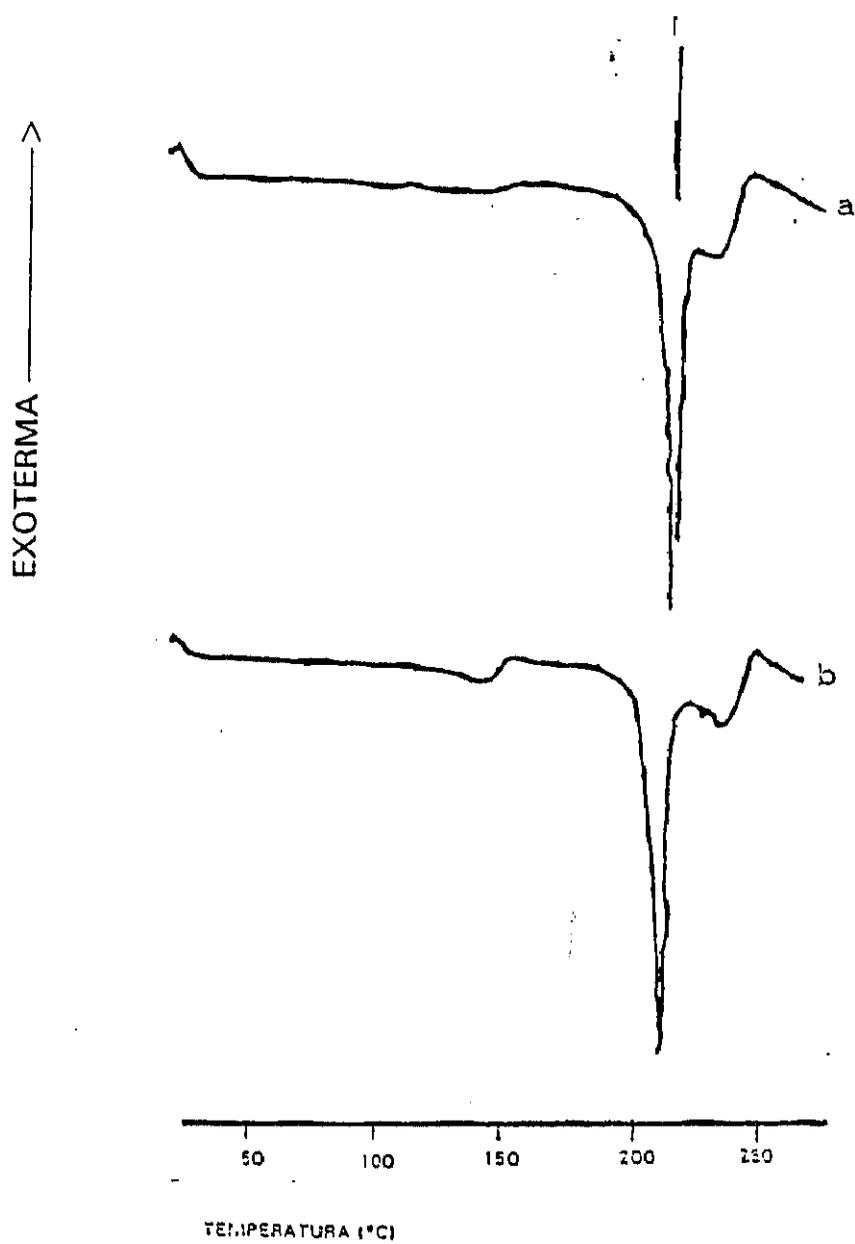


Figura 9. Termograma del albendazol patrón (a) y albendazol genérico (b).

## 4.2. METODOS DE OBTENCION DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES DE ALBENDAZOL.

### 4.2.1. Soluciones líquidas.

Para la preparación de soluciones líquidas y con el fin de conseguir elevadas concentraciones de albendazol en la solución, se utiliza el baño de ultrasonidos para la disolución del albendazol en el vehículo.

Se estudia el efecto del Ph y también la combinación con distintos disolventes (aceite de ricino polioxietileno, transcuto<sup>l</sup><sup>R</sup>) y tensoactivos (tween 20 y lauril sulfato sódico), en la solubilidad del albendazol a fin de establecer las condiciones óptimas para la formulación.

Las condiciones óptimas para la formulación de las soluciones líquidas resultan ser las siguientes:

- SIGEN-ABZ: Albendazol genérico en solución H, (Transcuto<sup>l</sup><sup>R</sup> en solución tampón Ph 1,2 al 40%) al 0,5 %.
- SISKF-ABZ: Albendazol patrón en solución H (Transcuto<sup>l</sup><sup>R</sup> en solución tampón Ph 1,2 al 40% ) al 0,5%.

Basándonos en los resultados obtenidos con albendazol se formulan estas mismas soluciones líquidas con el ricobendazol: SI-RBZ: ricobendazol en solución H, ( Transcuto<sup>l</sup><sup>R</sup> en solución tampón Ph 1,2 al 40 %) al 0,5%.

#### 4.2.2. Dispersiones sólidas.

El método de obtención de las dispersiones sólidas fue el de los cosolventes.

Se estudia el efecto del peso molecular de la polivinilpirrolidona utilizada (3000, 17000 y 25000) y de las distintas proporciones albendazol/vehículo (1/10, 1/20, y 1/40 ).

La formulación de solubilidad mas exaltada resultó ser albendazol /kollindon<sup>12</sup> 1:40, hecho por el cual se seleccionó, en principio, para pruebas farmacológicas, sin embargo, el hecho de necesitar elevadas concentraciones de albendazol, hacía necesario el uso de grandes cantidades de producto disuelto en pequeños volúmenes de vehículo, para hacer posible la administración a ratones, sin problemas de expulsión del medicamento por vómitos.

Para los ensayos biológicos se seleccionan dos formulaciones y, al igual que ocurre con las soluciones líquidas, se formula una dispersión de ricobendazol de solubilidad exaltada, en las mismas condiciones que para el albendazol, así obtenemos:

- DsGEN-ABZ: Albendazol genérico/ kollindon<sup>R</sup> 12, 1:20.
- DsSKF-ABZ: Albendazol patrón/ kollindón<sup>R</sup> 12, 1:20.
- Ds-RBZ: Ricobendazol /kollindón<sup>R</sup> 12, 1:20.

#### 4.3. MÉTODO DE ESTUDIO BIOFARMACEUTICO Y FARMACOCINETICO.

##### 4.3.1. Método de estudio biofarmacéutico y farmacocinético de la formulaciones seleccionadas.

###### 4.3.1.1. Animales de experimentación.

Ratones Swiss CD-1 de 30-35 g. de peso, dispuestos en distintos lotes. El número de animales de cada lote varia en función del número de puntos a determinar para cada fármaco en las distintas experiencias. Al igual que en los ensayos farmacológicos, se utilizan ratones de características homogéneas, utilizando en este caso un único sexo en todo el lote de animales, a fin de evitar la posible variabilidad metabólica entre sexos.

Para cada punto de tiempo determinado, se utilizaron tres ratones sacrificados a ese tiempo dado.

###### 4.3.1.2. Fármacos y dosis utilizadas.

Las formulaciones con las cuales se realizó el estudio farmacocinético fueron las siguientes:

- Albendazol patrón.
- Albendazol genérico.
- Solución líquida de Albendazol patrón.
- Solución líquida de Albendazol genérico.
- Dispersión sólida de albendazol genérico.
- Dispersión sólida de Albendazol patrón.
- Ricobendazol.

Todos los fármacos se administraron por vía oral mediante sonda buco-gástrica.

Los productos puros se suspendían previamente en solución de carboximetilcelulosa sódica 1% y las dispersiones sólidas en agua destilada, mientras que las soluciones líquidas se administraban como tal.

#### 4.3.1.3. Obtención de muestras sanguíneas.

Para la obtención de plasma, los ratones se anestesiaron con uretano 15%, una vez alcanzado el plano de anestesia quirúrgica (pérdida del reflejo óculo-parpebral), la sangre se obtenía directamente por apertura de la caja torácica, con la precaución de dejarla fluir libremente, evitando de este modo que ésta pueda quedar diluida con el contenido de fluidos de los distintos órganos. Se recogía mediante pipetas pasteur limpias y heparinizadas, depositándola individualmente en viales de plástico.

Tras la extracción, la sangre se centrifugaba durante 7min. a 6000 rpm, separando el plasma del resto de los componentes sanguíneos y se congelaba en viales de plástico a - 20 °C hasta el momento del análisis por la técnica de HPLC.

#### 4.3.1.4. Determinación de la concentración plasmática de ABZSO por HPLC.

Para el análisis de las concentraciones plasmáticas de albendazol y sus metabolitos por la técnica de HPLC, se toma un volumen de 400  $\mu$ l de plasma que se mezcla con 2 ml de metanol, posteriormente se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se filtra por un filtro Millipore HVLP de 45  $\mu$ m y se determina por HPLC el albendazol y su principal producto metabólico, albendazol sulfóxido (ricobendazol).

La ausencia de albendazol en plasma, tras la administración oral de ambas muestras de albendazol, es debida a un efecto de primer paso hepático previo a la absorción, que junto al alto grado de metaboliza-

ción que sufren estas moléculas en el hígado, justificaría la rápida aparición del sulfóxido (ABZSO) en plasma. Este hecho ya ha sido comentado en numerosos trabajos anteriores y como consecuencia el perfil farmacocinético se estudia en función del albendazol sulfóxido ( Galtier, 1991a y 1991b.)

La rápida sulfoxidación de la molécula de albendazol es facilitada por el menor impedimento estérico que ofrece la cadena alifática adyacente, comparada con otros bencimidazoles en los cuales el radical es un anillo aromático, como en el caso del febendazol (Hennessy D.R y col., 1989).

En la tabla 4, se recogen los resultados medios y desviación estándar de los siguientes parámetros farmacocinéticos (  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-6h}$ ) determinados para ambos albendazoles y sus formulaciones correspondientes (S.Torrado, 1994; Tesis doctoral).

Tabla 4.

FORMULACIONES	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ ( $\mu$ g/ml)	ABC ( $\mu$ gh/ml)
GEN-ABZ	0,67(0,2)	12,8(0,8)	45,12(8,8)
SKF-ABZ	1,83(0,3)	26,8(3,2)	84,19(18,16)
DsGEN-ABZ	0,25 (0,0)	29,57 (2,7)	91,33 (11,5)
SIGEN-ABZ	0,25 (0,0)	50,83 (3,2)	93,15 (27,7)
DsSKF-ABZ	0,67 (0,2)	30,53 (2,0)	107,08 (13,9)
SISKF-ABZ	0,33 (0,2)	45,27 (8,1)	82,21 (14,1)

Las características farmacocinéticas del albendazol varían entre especies. En nuestras experiencias,  $T_{max}$  se alcanza a tiempos relativamente cortos, esta diferencia puede ser debida a la variación interespecífica o al efecto del

vaciamiento gástrico, ya que la administración del fármaco se realizó de forma independiente a las comidas.

La constante de eliminación y semivida de eliminación no fue posible determinarlas ya que las concentraciones plasmáticas a  $t > 6$  horas se mantuvieron estables, posiblemente por un efecto del ciclo enterohepático, unión a proteínas plasmáticas o a un fenómeno de redistribución en tejidos, efecto descrito por D.R Hennessy y col en 1989, al encontrar una concentración de ABZSO biliar 4 veces superior a la plasmática cuando administraba albendazol a ovejas. También describió un alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas para los metabolitos del albendazol, la cual aumentaba con el tiempo, aunque esta unión la consideraba débil en comparación con ticlabendazol (Hennessy 1987), ya que los metabolitos del albendazol, podían ser extraído completamente del plasma sin un tratamiento previo con disolventes orgánicos.

En las figuras 10 y 11 (concentraciones plasmáticas/tiempo) se representa el perfil farmacocinético de ambas muestras de albendazol y sus respectivas formulaciones.

Para realizar el estudio comparativo de los parámetros estudiados , se realizó un análisis de la varianza, encontrándose:

1. En los productos puros, un valor de  $T_{max}$ ,  $C_{max}$  ( $p < 0,001$ ) y  $ABC_{0-6h}$  ( $p < 0,05$ ) significativamente mayor para el albendazol patrón.
2. Entre el albendazol patrón y sus formulaciones, no se apreciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el ABC, aunque sí en el valor de  $t_{max}$  ( $p < 0,001$ ), que suele ser menor en las soluciones líquidas y en las dispersiones sólidas. El valor de  $C_{max}$  es significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) para la solución líquida que para el albendazol patrón y dispersión sólida de éste.
3. Entre el albendazol genérico y sus formulaciones, si aparecen diferencias significativas en los valores de ABC; así, el albendazol genérico

---

presenta valores menores de niveles plasmáticos que sus formulaciones correspondientes. En la solución líquida se produce un desplazamiento del  $T_{max}$  (aparece antes)  $p < 0,05$  y un mayor valor de  $C_{max}$  ( $p < 0,001$ ), que el albendazol de referencia y formulado como dispersión sólida.

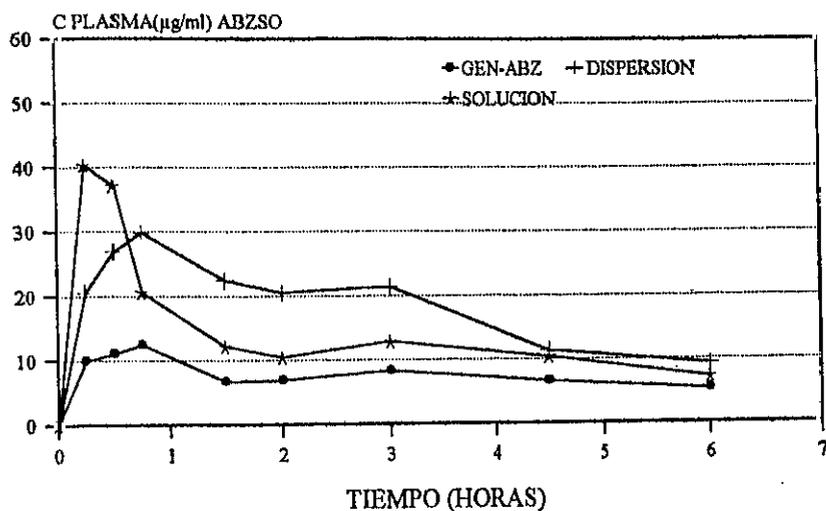
4. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados entre las formulaciones líquidas  $p > 0,05$ .

En cualquier caso se observa cierta homogeneidad en el comportamiento de cada grupo de formulaciones:

Valores de  $T_{max}$  mas tempranos en las soluciones líquidas con altos valores de  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  tardíos y  $C_{max}$  bajos cuando se administra el producto sólido de partida como tal, y valores intermedios en las dispersiones.

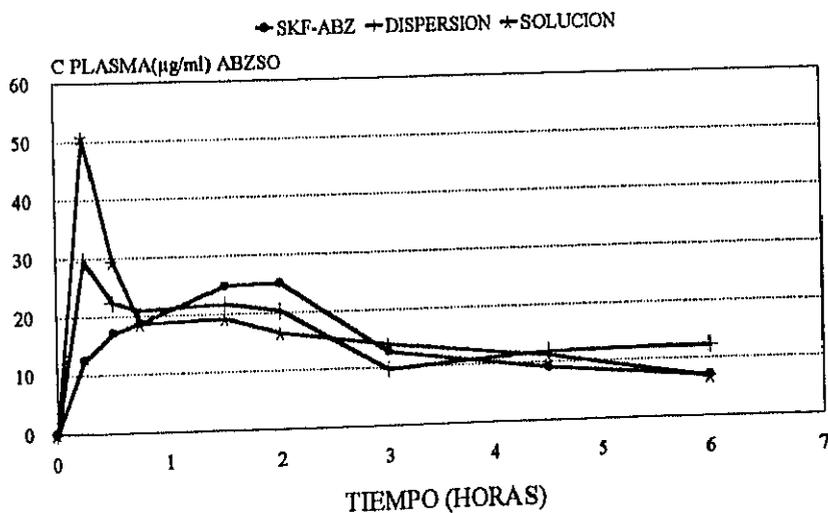
En cuanto a los valores de biodisponibilidad, expresados como ABC, a excepción del albendazol genérico, las demás formulaciones no difieren unas de otras de manera tan acusada como lo hacen  $C_{max}$  y  $T_{max}$ .

FIGURA 10. FARMACOCINETICA DE GEN-ABZ  
EN FORMA DE DISPERSION SOLIDA,  
Y SOLUCION LIQUIDA. Dosis 50 mg/kg



GEN-ABZ = albendazol genérico

FIGURA 11. FARMACOCINETICA DE SKF-ABZ  
EN FORMA DE DISPERSION SOLIDA,  
Y SOLUCION LIQUIDA. Dosis 50 mg/kg



SKF-ABZ = albendazol patrón.

#### **4.3.2. Método de estudio biofarmacéutico y farmacocinético del Albendazol administrado junto a inhibidores microsomales hepáticos.**

##### **4.3.2.1. Animales de experimentación.**

Se utilizan ratones Swiss CD-1, siguiendo las mismas pautas de distribución que en el punto 4. 3.1.1.

##### **4.3.2.2. Fármacos y dosis administradas.**

Para el estudio del efecto modulador de los inhibidores enzimáticos, sobre los parámetros farmacocinéticos del albendazol, se utilizó el Albendazol Genérico ( lote 2) "GEN<sup>®</sup>-ABZ" junto con los siguientes inhibidores de su metabolismo:

- Metimazol (MTZ): Inhibidor del sistema monooxigenasa citocromo-p 450 dep.
- Metirapona (MTP): Inhibidor selectivo citocromo-p450

Al igual que ocurría en el apartado 4.3.1; previo a la preparación de las concentraciones a ensayar, se determinaba el peso medio de cada lote de ratones utilizado, para así asegurar que todos los ratones pertenecientes a un mismo lote, recibían exactamente la misma dosis.

La suspensión de albendazol en carboximetilcelulosa sódica al 1% se realizaba con ayuda de un homogenizador VIRTISHEAR, preparando primero la suspensión de mayor concentración y, a partir de ella, las de menor concentración. La administración se realizó mediante sonda buco-gástrica, manteniendo la suspensión en agitación continua en un agitador magnético.

El metimazol se disolvía en solución salina fisiológica y se administraba en un volumen de 50  $\mu$ l intramuscularmente, utilizando para

ello una microjeringa HAMILTON, inmediatamente después de la administración del benzimidazol.

La metirapona se disolvía en agua destilada y se administraba por vía subcutánea mediante microjeringa HAMILTON, en un volumen de 50  $\mu$ l, inmediatamente después de la administración del benzimidazol.

#### 4.3.2.3. Recogida de muestras sanguíneas y análisis por HPLC.

Se siguieron las mismas pautas que en los apartados 4.3.1.3. y 4.3.1.4.

A partir de los datos experimentales se calculan los siguientes parámetros biofarmacéuticos y farmacocinéticos:

$T_{max}$  (experimental) y  $C_{max}$  (experimental), se calculaba mediante media de los datos experimentales obtenidos para cada metabolito.

El área bajo la curva (ABC) de las concentraciones plasmáticas entre los distintos tiempos ( $t=0$  y  $t=6$ , en el caso de las formulaciones y  $t=0$  y  $t=60$  h, para los inhibidores metabólicos), se calculó según el método de los trapecios (modelo independiente, ROWLAND, 1989).

#### 4.4. TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS.

##### 4.4.1. Dosis infestante.

En todos los casos, los ratones eran infestados con  $300 \pm 50$  larvas de T. spiralis.

##### 4.4.2. Infestación con larvas obtenidas previa digestión de las canales.

Se siguió la técnica de Martínez Fernández (1978), con ligeras modificaciones. Se partió de ratones infestados para el mantenimiento de las cepas de Trichinella en el laboratorio, que eran sacrificados por dislocación cervical. Una vez pelados y eviscerados, se trituraba la canal con una picadora MOULINEX y se añadía el líquido digestivo cuyos componentes eran: 0,5% de pepsina (Merck 2.000 FIP-U/g), 0,7% de ácido clorhídrico concentrado (Panreac) y 0,9% cloruro sódico (Panreac), en agua destilada, añadiendo 100 cc del líquido preparado, por cada 10 g de carne.

El homogeneizado así obtenido se disponía en frascos de plástico con tapón de rosca y se llevaba a un agitador de incubación NEW BRUSWICK a 37°C y 200 rpm durante 1,30 horas.

Concluida la digestión, el contenido del frasco se pasaba por mallas tipo "gasa sanitaria" de 24 hilos /cm<sup>2</sup> y el líquido filtrado se recogía en copas de sedimentación, enrasando con solución salina 0,9%. Se dejaba en reposo el tiempo necesario para la sedimentación de las larvas (aproximadamente 20 min). y se sifonaba el líquido sobrenadante. El sedimento se pasaba a un Baermann con solución fisiológica.

A continuación se procedía al recuento de las larvas obtenidas, utilizando una cámara McMaster y un microscopio OLYMPUS BH -2 a 4x.

El llenado de la cámara se realizaba con una pipeta Pasteur provista de bulbo de goma, disponiendo el vaso con las larvas sobre un agitador magnético, para que la toma de muestra fuera lo mas homogénea posible.

Se hacían dos recuentos y se calculaba la media aritmética, a continuación se multiplicaba por un factor 6,66, obteniéndose el número de larvas por ml, que referido al volumen inicial nos daba el número total de larvas aisladas; teniendo en cuenta el número de larvas a inocular  $300 \pm 50$  y el volumen del inóculo por ratón (0,4 ml) se aplicaban los cálculos matemáticos necesarios. Cuando, para obtener el volumen final adecuado había necesidad de concentrar o diluir la suspensión inicial, se volvía a realizar el recuento según las pautas indicadas.

Seguidamente se llevaba a cabo la inoculación de los lotes experimentales mediante sonda buco gástrica, manteniendo siempre la suspensión de larvas en continua agitación.

#### 4.4.3. Aplicación de los fármacos.

Previamente a la preparación de las concentraciones a ensayar, se disponían los ratones en los lotes correspondientes, hallando el peso medio/ratón, mediante una balanza METTLER PC 2.200. Las dosis eran calculadas en función del volumen máximo que un ratón puede recibir, sin que aparezcan problemas de expulsión por vómitos. La administración se realizaba mediante sonda buco gástrica.

En el caso de administrar distintas dosis de un mismo fármaco, se preparaba la dosis de mayor concentración y a partir de ella se realizaban las diluciones correspondientes para obtener las dosis mas bajas.

Exceptuando las soluciones líquidas que se administraban como tal, previo cálculo del volumen a inocular (ajuste de la concentración de partida a la concentración correspondiente a la dosis requerida.), el resto de los fármacos se suspendían en distintos vehículos:

- Los productos sólidos que incluyen: SKF-ABZ, GEN-ABZ, GEN\*-ABZ, RBZ\* y RBZ, se suspendían en una solución de carboximetilcelulosa sódica al 1 %; la suspensión se realizaba mediante un homogenizador, manteniendo la suspensión en continua agitación durante la aplicación.
- Las dispersiones sólidas: DsSKF-ABZ, DsGEN-ABZ y Ds-RBZ, se solubilizaban en agua destilada. En caso de obtener soluciones muy densas, por tener necesidad de alcanzar elevada concentración, la solución se mantenía en agitación durante su administración.

El antihelmíntico utilizado para la supresión de la población intestinal, en las experiencias sobre la fase emigrante de T. spiralis, fue Neguvón<sup>R</sup> a la dosis de 70 mg/ kg administrado en el día 9 post-infestación, conjuntamente con sulfato de atropina (1 mg/ ml) a la dosis de 0,05 mg/ kg, para paliar los efectos secundarios del organofosforado; el tratamiento supresor se realizaba por vía oral mediante sonda buco-gástrica, recibiendo cada ratón 0,2 ml de Neguvón<sup>R</sup> en agua destilada. El sulfato de atropina (50 µl) se administraba inmediatamente después, por vía intramuscular.

Todos los inhibidores del metabolismo microsomal hepático se administraban inmediatamente después del tratamiento antihelmíntico, en un volumen variable según la vía de administración así:

- Metimazol<sup>R</sup>: Se disolvía en solución salina 0,9 % y se administraba con ayuda de una microjeringa en un volumen de 50 µl, intramuscularmente.
- Metirapona<sup>R</sup>: Se utilizaba como vehículo agua destilada y se administraba en un volumen de 50 µl, por vía subcutánea.

#### 4.4.4. Digestión de la canal y recuento de larvas.

Se siguió la técnica indicada en el apartado 4.4.2; los ratones una vez sacrificados se pelaban y evisceraban; cada canal se trituraba y homogeneizaba con la cantidad proporcional al peso de líquido digestivo. A continuación se pasaba a un frasco de plástico que se mantenía en incubación, en un agitador NEW BRUNSWICK durante el período de tiempo

oportuno para producir una digestión total de la canal (aproximadamente 3 horas).

El material digerido se pasaba por una malla y el líquido filtrado, correspondiente a cada canal, se llevaba a vasos de precipitados de 200 ml; procediéndose al recuento en cámara McMaster, de larvas vivas y muertas.

#### **4.4.5. Recuperación de adultos y recuento.**

Se siguió la técnica de DENHAM y MARTINEZ (1970). Se sacrificaban los animales por dislocación cervical; tomando el intestino delgado que se separaba por tracción a partir del duodeno. Se abría longitudinalmente cada intestino con ayuda de unas tijeras y se troceaba en porciones de 2 a 3 cm, que se recogían en gasas hidrófilas de 24 hilos/cm<sup>2</sup> y se introducían en botes de heces de plástico de 100 ml de capacidad, con tapón de rosca, que contenían solución salina fisiológica. Se incubaban a 37 °C durante 2 horas, para producir la autólisis de la mucosa y liberación de los vermes.

Transcurrido el período de incubación, se retiraban las mallas que contenían los intestinos y se recuperaba el contenido del bote en el cual se hallaban los adultos sedimentados.

Mediante trompa de vacío, se sifonaba la cantidad de solución salina que sobraba para hacer posible el recuento en placa de petri reticulada. Para hacer mas visibles los vermes se añadían unas gotas de tintura de yodo, tiñéndolos para facilitar el recuento.

Se realizaban tantos recuentos como fuera necesario hasta obtener unos resultados mas o menos homogéneos, en el estereomicroscopio OLYMPUS al menor aumento, determinándose la media aritmética de los recuentos.

---

#### **4.5. ANALISIS ESTADISTICO.**

##### **4.5.1. Estadística de las pruebas biofarmacéuticas y farmacocinéticas.**

Se comparan los parámetros farmacocinéticos  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $ABC_{t=0-t=6h}$ ,  $ABC_{t=0-t=60h}$ , mediante análisis de la varianza de una vía, aplicando el programa de estadística MICROSTAT.

##### **4.5.2. Estudio estadístico de las pruebas farmacológicas.**

Sobre las muestras extraídas a partir de las poblaciones consideradas, se han estimado los siguientes parámetros: media aritmética, error estandar, t-student (como método comparativo de dos muestras) calculadas mediante el programa de estadística anterior.

Una vez determinada la t-student, se establece su significación estadística, considerando no significativos aquellos valores con  $p > 0,05$ .

## **EXPERIENCIAS REALIZADAS**

## 5.1. ALBENDAZOL COMO MATERIA PRIMA.

### 5.1.1. Introducción.

Dentro del mercado farmacéutico podemos encontrar fármacos " genuinos " (suministrados por la casa comercial que ostenta la patente) y fármacos denominados "genéricos" pertenecientes a otras casas comerciales. La característica fundamental que siempre han de reunir los segundos, es la de ser bioequivalentes a los primeros, para lo cual cada casa comercial ha de realizar su propio control de calidad.

El hecho de que el albendazol se esté utilizando cada vez con mayor frecuencia y éxito en la terapia antiparasitaria, ha sido el motivo por el cual decidimos estudiar la actividad antiparasitaria de dicho fármaco, introduciendo una serie de mejoras desde el punto de vista farmacotécnico. Sorprendentemente los resultados obtenidos fueron muy inferiores, en cuanto a eficacia se refiere, a los esperados y a los encontrados en la bibliografía. Tras repetir las experiencias, en las que nuevamente se obtuvieron estos resultados poco esperanzadores, se decidió probar nuevamente, pero en esta ocasión utilizando un albendazol cedido por la firma que ostenta la patente. Los resultados obtenidos con este nuevo albendazol fueron espectacularmente distintos y superiores a los obtenidos con el albendazol inicial. Esta diferencia de eficacia antihelmíntica, obtenida con un mismo producto comercializado por dos laboratorios diferentes, y la extraordinaria importancia sanitaria que puede derivarse de dicha diferencia, nos indujo a realizar un estudio completo de caracterización de ambos albendazoles, tanto de su actividad antiparasitaria como de sus características fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas.

Se disponía de dos lotes de albendazol: SKF-ABZ, suministrados por Smithkline Beechan Pharmaceutical (albendazol genuino), GEN-ABZ, suministrado por Chemo Ibérica (albendazol genérico). Ambos lotes fueron aplicados sobre las tres fases del ciclo biológico de T. spiralis.

1. Fase intestinal o fase en la cual el parásito se encontraría en estado de "preadultos" correspondiente al momento en el cual el parásito establece en la mucosa intestinal.
2. Fase de asentamiento muscular o período de toma de contacto de larvas con el músculo después de su migración.
3. Fase de infestación muscular, en la cual el parásito alcanza situación de "espera" en el tejido muscular del hospedador.

Tras realizar el estudio farmacológico, farmacotécnico y biofarmacéutico comparado de ambas muestras de albendazol, se atribuyeron las diferencias encontradas, a un error en el proceso de síntesis del albendazol genérico que podría haber sido subsanado en lotes siguientes (S. Torrado 1994). Para comprobar este hecho, se optó por determinar de nuevo la actividad antiparasitaria de un segundo lote de albendazol genérico en nuestro modelo experimental.

### 5.1.2. Experiencias sobre la fase o estado de preadultos.

Los ratones fueron infestados con  $300 \pm 50$  larvas de T. spiralis GM-1, según las técnicas ya descritas.

A partir de ese momento los ratones fueron separados, en lotes de 8 a 10 animales, para constituir los distintos grupos experimentales. El tratamiento antihelmíntico se administraba a las 24 horas post-infestación(p.i.) mediante sonda buco-gástrica, según las siguientes pautas: SKF-ABZ ; 5 mg/kg, 10 mg/kg., GEN-ABZ ; 5 mg/kg, 10 mg/kg y 5 mg/kg en dosis fraccionadas, administradas a las 20, 24 y 28 horas p.i.

En todos los casos se evaluó la eficacia del tratamiento en el día 6º post-tratamiento(p.t.), precediéndose al sacrificio de los animales, aislamiento y recuento de la población adulta, al objeto de realizar los cálculos matemáticos oportunos.

### 5.1.3. Experiencias sobre la fase de asentamiento muscular o estado de larvas emigrantes.

Una vez realizada la infestación de los animales constituyentes de los distintos lotes experimentales. El tratamiento antihelmíntico se realizó en dos fases:

1. Con el objeto de eliminar por completo la población de adultos remanente en el intestino, asegurando así que el tratamiento antihelmíntico iba a afectar solamente a los embriones "circulantes", los animales fueron tratados con neguvón<sup>R</sup>(70 mg/kg) junto con sulfato de atropina(0,05 mg/kg), con el fin de atenuar los efectos secundarios desencadenados por el organofosforado. El tratamiento supresor se realizó el día 9º p.i., y su eficacia se controlaba mediante un lote testigo paralelo, dos días después.

2. El tratamiento antihelmíntico se efectuaba durante los días 13, 14 y 15 p.i., administrándose las dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, para los fármacos(SKF-ABZ y GEN-ABZ, GEN<sup>\*</sup>-ABZ).

La determinación de la eficacia se realizaba el día 30 p.i., procediéndose al sacrificio de los animales por dislocación cervical, digestión de la canal y recuento de larvas vivas y muertas de los lotes testigo y tratados, según las técnicas descritas en el punto 4.4.4, con el objeto de calcular los porcentajes de reducción de cada lote problema con respecto al testigo correspondiente, y el porcentaje de larvas muertas, con respecto al total de las aisladas en cada lote.

#### **5.1.4 Experiencias sobre la fase muscular.**

En esta experiencia se ensayaron las mismas dosis orales de cada lote de albendazol indicadas en el punto anterior. El tratamiento antihelmíntico se realizó durante los días 34, 35 y 36 p.i.

Los animales eran sacrificados el día 46 p.i. realizándose la digestión, aislamiento y recuento de larvas vivas y muertas, para la posterior determinación de la eficacia del tratamiento antihelmíntico, así como el estudio comparativo entre ambos fármacos, siguiendo las técnicas generales.

#### **5.1.5. Estudio biofarmacéutico y farmacocinético.**

Para el estudio farmacocinético, se emplearon ratones Swiss CD-1, dispuestos en distintos lotes experimentales, teniendo en cuenta que para cada punto de determinación se utilizó la media obtenida de tres ratones.

Se preparó una suspensión de los fármacos a ensayar en carboximetilcelulosa sódica al 1%, a una concentración equivalente a una dosis de 50 mg/kg para ambos (SKF-ABZ y GEN-ABZ). La administración se realizó mediante sonda buco-gástrica.

Los tiempos de análisis fueron los siguientes: 0,25; 0,50; 0,75; 1,5; 2; 3; 4,5; y 6 horas.

Tras la extracción, la sangre se centrifuga durante 7 minutos a 6000 r.p.m, separando el plasma del resto de los componentes sanguíneos y guardándose a - 20 °C hasta el momento del análisis por la técnica de HPLC.

## 5.2. RICOBENDAZOL (ALBENDAZOL SULFOXIDO).

### 5.2.1 Bioequivalencia.

La diferencia de eficacia antihelmíntica obtenida con un mismo producto (albendazol) comercializado por dos laboratorios diferentes y la extraordinaria importancia sanitaria que puede derivarse de esta diferencia, nos indujo a realizar un estudio previo de la actividad antihelmíntica del ricobendazol, dado que también disponíamos de dos lotes de distinta procedencia:

- RBZ, ricobendazol procedente de Robert Young and Co.
- RBZ\*, ricobendazol suministrado por Chemo Ibérica s.a.

Ambos lotes fueron aplicados sobre la fase, quizás, mas resistente al tratamiento antihelmíntico (fase de adultos) y se compararon resultados.

#### 5.2.1.1 Experiencias sobre la fase o estado de adultos.

Los ratones fueron infestados con  $300 \pm 50$  larvas de T. spiralis, GM-1 según las técnicas ya descritas.

A partir de ese momento los ratones fueron separados en lotes de 8 a 10 animales, para constituir los distintos grupos experimentales.

El tratamiento antihelmíntico se realizaba en el día 6º p.i mediante sonda buco-gástrica, según la siguiente pauta y régimen de dosificación:

- Ambos lotes de ricobendazol (RBZ Y RBZ\*) se administraron en dosis de 40, 20 y 10 mg/kg fraccionadas en dos tomas, con un intervalo de 6 horas entre cada toma.

En todos los casos se evaluó la eficacia del tratamiento antihelmíntico en el día 8º p.t , procediéndose al sacrificio de los animales, aislamiento y recuento de la población adulta remanente, al objeto de realizar los cálculos matemáticos oportunos.

## 5.2.2 Actividad antiparasitaria.

De la experiencia anterior pudimos concluir que no existe diferencia significativa en cuanto a actividad antihelmíntica entre ambas muestras, por lo que podríamos utilizar indistintamente un lote u otro, decidiéndonos por el ricobendazol suministrado por Robert Young and Co.(RBZ).

### 5.2.2.1 Experiencias sobre el estado de preadultos.

Los ratones fueron infestados con  $300 \pm 50$  larvas de T.spiralis GM-1, según las técnicas ya descritas. A partir de ese momento los ratones fueron separados, en lotes de 8 a 10 animales, para constituir los distintos grupos experimentales. El tratamiento antihelmíntico se administraba a las 24 horas post-infestación(p.i.) mediante sonda buco gástrica, según las siguientes pautas: RBZ ; 5 mg/kg, 10 mg/kg dosis únicas.

En todos los casos se evaluó la eficacia del tratamiento en el día 6<sup>o</sup> post-tratamiento(p.t.), procediéndose al sacrificio de los animales, aislamiento y recuento de la población adulta al objeto de realizar los cálculos matemáticos oportunos.

### 5.2.2.2 Experiencias sobre la fase de asentamiento muscular o estado de larvas emigrantes.

Una vez realizada la infestación de los animales constituyentes de los distintos lotes experimentales. El tratamiento antihelmíntico se realizó en dos fases:

1. Con el objeto de eliminar por completo la población de adultos remanente en el intestino, asegurando así que el tratamiento antihelmíntico iba a afectar solamente a los embriones "circulantes", Los animales fueron tratados con

neguvón<sup>R</sup>(70 mg/kg) junto con sulfato de atropina (0,05 mg/kg), con el fin de atenuar los efectos secundarios desencadenados por el organofosforado.

El tratamiento supresor se realizó el día 9<sup>o</sup> p.i. La eficacia del tratamiento supresor se controlaba mediante un lote testigo paralelo, dos días después.

2. El tratamiento antihelmíntico se efectuaba durante los días 13, 14 y 15 p.i. administrándose las dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg

La determinación de la eficacia se realizaba el día 30 p.i., procediéndose al sacrificio de los animales por dislocación cervical, digestión de la canal y recuento de larvas vivas y muertas de los lotes testigo y tratados, según las técnicas descritas en el punto 4.4.4, con el objeto de calcular los porcentajes de reducción de cada lote problema con, respecto al testigo correspondiente, y el porcentaje de larvas muertas, con respecto al total de las aisladas en cada lote.

### **5.2.2.3 Experiencias sobre la fase muscular.**

En estas experiencias se ensayaron las mismas dosis orales de ricobendazol indicadas en el punto anterior. El tratamiento antihelmíntico se realizó durante los días 34, 35 y 36 p.i.

Los animales eran sacrificados el día 46 p.i. realizándose la digestión, aislamiento y recuento de larvas vivas y muertas para la posterior determinación de la eficacia del tratamiento antihelmíntico, así como el estudio comparativo entre ambos fármacos, siguiendo las técnicas generales.

### 5.2.3. Estudio biofarmacéutico y farmacocinético.

Para el estudio farmacocinético, se emplearon ratones Swiss CD-1, dispuestos en distintos lotes experimentales, teniendo en cuenta que para cada punto de determinación se utilizó la media obtenida de tres ratones.

Se preparó una suspensión de ricobendazol en carboximetilcelulosa sódica al 1%, a una concentración equivalente a una dosis de 50 mg/kg. La administración se realizó mediante sonda buco-gástrica.

Los tiempos de análisis fueron los siguientes: 0,25; 0,50; 0,75; 1,5; 2; 3; 4,5; y 6 horas.

Tras la extracción, la sangre se centrifuga durante 7 minutos a 6000 r.p.m., separando el plasma del resto de los componentes sanguíneos y guardándose a - 20 °C hasta el momento del análisis por la técnica de HPLC.

### 5.3. POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA, MEDIANTE FORMULACIONES DE SOLUBILIDAD EXALTADA.

#### 5.3.1. Introducción

De entre los antihelmínticos, los benzimidazolcarbamatos son el grupo mas ampliamente usado, tanto en medicina humana como veterinaria. En particular, el albendazol es considerado como uno de los fármacos mas prometedores en el tratamiento no solo de helmintos sino también de ciertos protozoos. No obstante su eficacia, especialmente contra estados tisulares, se ve limitada por la pobre capacidad de absorción y, en consecuencia baja biodisponibilidad del fármaco.

El factor limitante en la absorción de medicamentos poco solubles es la velocidad de disolución (Pla Delfina, 1982); en todos estos medicamentos cualquier recurso tecnológico de formulación que aumente o mejore la solubilidad puede facilitar la absorción y aumentar la biodisponibilidad. Uno de estos recursos tecnológicos es el empleo de " dispersiones sólidas ". Se han realizado dispersiones sólidas de mebendazol, utilizando como matriz polivinilpirrolidona (Fernández, 1988); polietilen glicol (Chiba y col, 1991), aumentando la velocidad de disolución y la biodisponibilidad de los nuevos preparados, así como su actividad antiparasitaria.

Otra posible alternativa para facilitar la absorción de medicamentos poco hidrosolubles es la preparación de formulaciones líquidas, utilizando cosolventes y promotores de la absorción, como se han descrito en el trabajo de Del-Estal, 1991; 1993, quien utiliza como vehículo polioxietilensorbitol-monoleato (Tween-80) y sodiotaurocolato (STC), en una formulación de albendazol.

Por otro lado ricobendazol (RBZ), es un albendazol sulfóxido sintético mas soluble que el albendazol y por ello cabe esperar que su actividad antiparasitaria sea también mayor.

Como primer objetivo de nuestro trabajo se utilizaron estos dos recursos farmacotécnicos para realizar nuevas formulaciones de albendazol, se caracterizaron y se seleccionaron de entre las que presentaron solubilidad mas exaltada, las utilizables en pruebas farmacológicas, así como basándonos en estos resultados, se formularon otras de las mismas características pero utilizando como principio activo ricobendazol.

A la vista de los resultados obtenidos en las experiencias en las cuales se comparaban dos lotes de albendazol distintos, y en las cuales se confirmaba una diferencia significativa en cuanto a potencia farmacológica, se optó por realizar formulaciones de ambos, cumpliéndose así un doble objetivo:

- Potenciar la actividad antiparasitaria de un fármaco activo.
- Posibilidad de potenciar la actividad de un fármaco prácticamente inactivo igualándolo farmacológicamente a un fármaco patrón.

En una segunda fase se determinó la actividad antihelmíntica de las formulaciones elegidas en el modelo T.spiralis/ratón, comparándolas con los productos sólidos de partida.

Todas las formulaciones fueron estudiadas en todas las fases del ciclo biológico de T.spiralis según el siguiente protocolo:

### 5.3.2 Experiencias sobre la fase o estado de preadultos.

Los ratones fueron infestados con  $300 \pm 50$  larvas de T. spiralis. Para la distribución de los lotes experimentales, período de tratamiento y resultados, se operó según las técnicas descritas en el punto 5.1.1.

Los fármacos y dosis ensayadas fueron las siguientes:

FARMACOS	DOSIS ( mg/kg )		
SKF-ABZ	-	5	10
DsSKF-ABZ	2,5	5	10
SISKF-ABZ	2,5	5	10
GEN-ABZ	-	5	10
DsGEN-ABZ	2,5	5	10
SIGEN-ABZ	2,5	5	10
RBZ	-	5	10
Ds-RBZ	2,5	5	10
SI-RBZ	2,5	5	10

Todos los fármacos fueron administrados por vía oral mediante sonda buco gástrica a las 24 horas p.i. el aislamiento de adultos y recuento, se realizó 6 días después del tratamiento antihelmíntico.

Con el fin de determinar la eficacia límite, tanto de los fármacos albendazol y ricobendazol, como de las formulaciones descritas, se ensayaron las siguientes dosis:

FARMACOS	DOSIS ( mg/kg )
SKF-ABZ	2,5
DsSKF-ABZ	1
SISKF-ABZ	1
GEN-ABZ	2,5
DsGEN-ABZ	1
SIGEN-ABZ	1
RBZ	2,5
Ds-RBZ	1
SI-RBZ	1

### 5.3.3 Experiencias sobre la fase de asentamiento muscular.

Una vez infestados los ratones con  $300 \pm 50$  larvas de T. spiralis/ratón, realizado el tratamiento supresor de la población adulta remanente, se realizó el tratamiento antihelmíntico en los días 13, 14, y 15 p.i. La determinación de la eficacia se realizó en el día 30 p.i. siguiendo lo expuesto en el punto 5.1.3.

Los fármacos y dosis ensayadas se recogen en la siguiente tabla:

FARMACOS	DOSIS ( mg/kg )		
SKF-ABZ	-	50	100
DsSKF-ABZ	-	50	100
SISKF-ABZ	25	50	100
GEN-ABZ	-	50	100
DsGEN-ABZ	-	50	100
SIGEN-ABZ	25	50	100
RBZ	-	50	100
Ds-RBZ	-	50	100
SI-RBZ	25	50	100

#### **5.3.4 Experiencias sobre la fase muscular.**

Se siguió la misma metodología que en el punto 5.1.3, realizando el tratamiento antihelmíntico los días 34, 35 y 36 p.i. y la determinación de la actividad antiparasitaria el día 46 p.i.

Los fármacos y dosis administradas fueron las mismas que en la experiencia sobre la fase de asentamiento muscular (punto 5.3.3).

#### **5.3.5 Farmacocinética y estudio biofarmacéutico de las formulaciones utilizadas.**

Siguiendo la pauta general, se utilizaron ratones Swiss CD-1, a razón de tres ratones para cada punto de determinación, realizándose posteriormente la media aritmética.

Todos los fármacos y sus formulaciones correspondientes se administraron, mediante sonda buco-gástrica, a una dosis de 50 mg/kg. Para su preparación se siguió la técnica general, así, se determinaron los parámetros farmacocinéticos en los siguientes: - DsGEN-ABZ, SIGEN-ABZ, DsSKF-ABZ, SISKF-ABZ.

El perfil farmacocinético de las nuevas formulaciones de RBZ, no fue realizado, al suponer un comportamiento similar a las formulaciones del albendazol, ya que se utilizaron los mismos recursos farmacotécnicos de síntesis y por lo tanto el metabolito a determinar en sangre sería el mismo.

Los tiempos de recogida de muestra sanguínea fueron los mismos que los utilizados para realizar el perfil farmacocinético de los albendazoles de referencia. Una vez recogidas las muestras de plasma se congelaron a -20 °C hasta el análisis.

## 5.4. POSIBLE POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DEL ALBENDAZOL POR INHIBIDORES DE OXIDASAS MICROSOMALES.

### 5.4.1. Introducción.

Los resultados de las pruebas " *in vivo* " anteriores nos permiten deducir que si bien, las formulaciones probadas producen una mejora en cuanto a biodisponibilidad, la actividad antihelmíntica no se ve aumentada considerablemente, a excepción de las soluciones líquidas en algunas experiencias, como ocurría en el caso del mebendazol formulado como dispersión sólida (Fernandez, 1988). por lo cual y basándonos en hechos probados, en los cuales se produce una mejora en la actividad farmacológica de muchos medicamentos, por asociación de fármacos que mejoran sus características farmacodinámicas, farmacocinéticas o ambas, se pensó en utilizar inhibidores del metabolismo del albendazol, para así conseguir aumentar la biodisponibilidad de este, sobre todo en magnitud, al igual que se prolonga el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo.

Estudios farmacocinéticos en distintas especies animales, han demostrado que la vía oxidativa es la ruta metabólica principal del albendazol con la formación sucesiva de sulfóxido (ABZO) y sulfona (ABZSO<sub>2</sub>), (Delatour, 1991). Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de albendazol son prácticamente inapreciables, principalmente por sufrir este fármaco el efecto de primer paso hepático (Prieto, 1988).

Estudios farmacocinéticos con netobimin (precursor de albendazol, mas soluble), administrado junto con inhibidores de oxidasas hepáticas, (Lanusse, C.E y col.. 1991, 1992, Lanusse y Prichard 1992) demostraron que la administración conjunta aumentaba considerablemente la concentración plasmática y semivida del metabolito activo (ABZSO).

Dado que carecemos de información acerca de la influencia que ejercen estos inhibidores en la actividad antiparasitaria, pensamos en aplicarlos a

nuestro modelo T. spiralis/ratón; sin embargo surgieron una serie de inconvenientes ya que toda la información de la que partíamos procedía de estudios con netobimin, Además y según demuestran distintos trabajos (Souhaili-el Amri, 1988, con albendazol, Luder, 1986, con mebendazol, Gleizes, 1991 con oxfendazol y posteriormente con oxfendazol y fenbendazol 1991a, Murray, 1992 con fenbendazol), los benzimidazoles son inductores de su propio metabolismo; por lo cual resultaba difícil ajustar las dosis óptimas fármaco/inhibidor. Partiendo de estos hechos, se diseñaron las siguientes experiencias previas, para encontrar la relación entre dosis óptimas:

1. Se administraron varias dosis de inhibidor frente a una dosis fija de fármaco. Una vez determinada la dosis mas eficaz se diseña una segunda experiencia en la cual:
2. Se valoró el posible incremento en la actividad antiparasitaria ahora manteniendo fija la concentración de inhibidor y variando la del fármaco.

Una vez fijadas las dosis óptimas fármaco/inhibidor y a la vista de los resultados en los cuales se podía prever el efecto inductor enzimático del albendazol, sobre su propio metabolismo y partiendo del hecho de que ambos, fármaco e inhibidor, muestran una interacción farmacodinámica de tipo competitivo, se creyó necesario realizar estudios sobre la modificación en los perfiles farmacocinéticos del albendazol, diseñándose así el siguiente estudio:

3. Estudio de los parámetros farmacocinéticos y biofarmacéuticos de varias dosis de albendazol respecto a una dosis fija de inhibidor.

El estudio se realizó utilizando dos pautas posológicas distintas:

- a). Administración de una dosis única fármaco/inhibidor a  $t=0$ .
- b). Administración de dosis repetidas fármaco/inhibidor en tres días consecutivos, es decir, a los tiempos  $t=0, 24$  y  $48$  horas.

En ambas experiencias, los tiempos de toma de muestras sanguíneas fueron los mismos.

Estas experiencias se realizaron también en ratones infestados con larvas de *T. spiralis*, determinando la modificación de la respuesta al tratamiento antihelmíntico. El estudio se realizó sobre las fases de larvas emigrantes y muscular del ciclo biológico, por ser dichas fases las que muestran peor respuesta al tratamiento antihelmíntico, y ser la segunda, la de mayor interés farmacológico.

#### **5.4.2 Pruebas farmacológicas para determinar la dosis óptima en la relación fármaco/inhibidor.**

Previamente a establecer la relación fármaco/inhibidor se comprobó mediante una serie de pruebas preliminares que los medicamentos que utilizamos como inhibidores del metabolismo del albendazol y pese a estar dotados de actividad farmacológica (metimazol<sup>R</sup> droga antitiroidea, metirapona<sup>R</sup> droga antiesteroídica), no mostraban ningún efecto triquinelicida.

##### **5.4.2.1 Experiencias realizadas manteniendo fija dosis de albendazol y variando la de inhibidor.**

Las dosis de fármaco y de inhibidor utilizadas se recogen en la tabla siguiente:

FARMACO	DOSIS (mg/kg)		
GEN <sup>*</sup> -ABZ	100	100	100
INHIBIDORES	DOSIS (mg/kg)		
METIMAZOL <sup>R</sup>	1,5	3	6
METIRAPONA <sup>R</sup>	20	30	60

Los benzimidazoles se prepararon según la pauta general, es decir, se suspendían en una solución de carboximetilcelulosa sódica al 1% y se mantenían en agitación constante durante su administración por vía oral, inmediatamente después se administró el inhibidor correspondiente, por la vía adecuada.

Constaba de:

- LOTE 1: Control<sub>1</sub>, los animales no recibían ningún tratamiento.
- LOTE 2: Control<sub>2</sub>, los animales fueron tratados con albendazol 100 mg/kg.
- LOTE 3, 4 y 5: Los animales fueron tratados con albendazol 100 mg/kg junto con metimazol<sup>R</sup> 1,5, 3 y 6 mg/kg, respectivamente.
- LOTE 6, 7 y 8: Los animales recibieron albendazol 100 mg/kg mas metirapona<sup>R</sup> 20, 30 y 60 mg/kg, respectivamente.

El tratamiento antihelmíntico se realizó en los días 13, 14 y 15 p.i., en el caso de larvas emigrantes, (previamente todos los animales recibieron el tratamiento supresor en el día 9 p.i.) y los días 34, 35 y 36, cuando el tratamiento iba dirigido hacia larvas enquistadas. La determinación de la eficacia del tratamiento se realizó en los días 30 p.i. y 46 p.i., respectivamente.

5.4.2.2. Experiencias realizadas manteniendo fija la dosis de inhibidor y variando la de albendazol.

Basándonos en los resultados se consideraron como dosis óptimas de inhibidor las siguientes: metimazol<sup>R</sup> 3 mg/kg, metirapona<sup>R</sup> 30 mg/kg, así se realizó la siguiente experiencia que constaba de:

LOTE 1: Control, los animales no recibieron ningún tratamiento.

LOTE 2, 3: Controles <sub>2 y 3</sub>, los animales fueron tratados con albendazol 50 mg/kg(lote 2) y 75 mg/kg(lote 3).

LOTE 4, 5: Todos los ratones fueron tratados con albendazol 50 mg/kg más metimazol<sup>R</sup> 3 mg/kg(lote 4) y metirapona<sup>R</sup> 30 mg/kg (lote 5).

LOTE 6, 7: Los ratones recibieron una dosis de 75 mg/kg de albendazol junto con 30 mg/kg de metirapona<sup>R</sup>(lote 6) y 3 mg/kg de metimazol<sup>R</sup> (lote 7).

La preparación de los fármacos se hizo según la técnica general; el tratamiento antihelmíntico se realizó en los días 13, 14 y 15 p.i. (previa eliminación de la población adulta en el día 9º p.i.), en el caso de larvas emigrantes y en los días 34, 35 y 36 p.i., en el caso de larvas enquistadas. La determinación de la eficacia del tratamiento se realizó en los días 30 p.i., para el primer caso y el día 46 p.i., en el segundo, mediante digestión de las canales y recuento de larvas.

### 5.4.3. Estudio de los parámetros farmacocinético y biofarmacéuticos.

Para el estudio de la modificación de los parámetros farmacocinéticos y biofarmacéuticos que los inhibidores metabólicos ejercían sobre el albendazol, se diseñaron varias experiencias, manteniéndose en todas ellas las mismas condiciones de trabajo (distribución de los animales en los distintos lotes experimentales, administración de fármacos, períodos de toma de muestras sanguíneas y determinación y análisis por HPLC) a excepción del período de tratamiento.

#### 5.4.3.1. Estudio de la modificación de las concentraciones plasmáticas de ABZSO, tras la administración de inhibidores microsomales (dosis única t=0).

Animales de experimentación: Ratones CD-1 dispuestos en lotes de 3 animales para cada punto a determinar.

#### Fármacos e inhibidores utilizados:

GEN\*-ABZ: Partimos de una suspensión de 5,9 mg/kg, en carboximetilcelulosa al 1%, administrando las dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, por vía oral.

MTP: Solución de 14,16 mg/ml en agua destilada, administrándose una dosis de 30 mg/kg, subcutáneamente.

MTZ: Solución 2,04 mg/ml en solución salina, administrándose una dosis de 3 mg/kg, intramuscularmente.

La experiencia se dividió en los siguientes puntos:

1. Separación de los animales en los distintos lotes y administración de los fármacos:

LOTE 1: Los ratones recibieron 50 mg/kg de albendazol.

LOTE 2: Los ratones recibieron 100 mg/kg de albendazol.

LOTE 3: Tratamiento con GEN\*-ABZ 50 mg/kg /MTZ 3 mg/kg.

LOTE 4: Tratamiento con GEN\*-ABZ 100 mg/kg/MTZ 3 mg/kg.

LOTES 5 y 6: El tratamiento fue similar a los lotes 3 y 4 pero el inhibidor utilizado fue MTP 30 mg/kg.

Recogida de muestras sanguíneas: Se realizó en tubos heparinizados en los tiempos siguientes 15 min, 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h. Una vez recogida la sangre se separó el plasma por centrifugación y se mantuvo a -20 °C hasta el momento del análisis.

Determinación de las concentraciones plasmáticas: Para ello se utilizó la técnica HPLC.

5.4.3.2. Estudio de la modificación de las concentraciones plasmáticas de ABZSO y ABZSO2 tras la administración de inhibidores microsomales en los tiempos t=0, 24 y 48 horas.

Se utilizó el mismo modelo de experiencia que en el punto anterior, a diferencia de la duración del tratamiento que en este caso fue 3 días consecutivos, es decir, los fármacos se administraron a los tiempos 0, 24 y 48 horas. Los tiempos de toma de muestra sanguínea fueron los siguientes: 3, 6, 12, 24, 27, 36, 48, 51, 60 horas. Número de lotes, fármacos y dosis administradas fueron las mismas. Para el análisis se utilizó la técnica de HPLC.

De los resultados obtenidos se concluyó que; dosis únicas (un día de tratamiento) de albendazol 50 mg/kg/MTZ 3 mg/kg, aumentaba las concentraciones plasmáticas de ABZSO y las mantenían durante más tiempo, que el mismo régimen de dosificación pero aplicado en tres días consecutivos; esto mismo ocurría con el tratamiento con albendazol 100 mg/kg/MTP 30 mg/kg, por lo que una vez fijadas las condiciones óptimas se realizaron las siguientes experiencias farmacológicas:

**5.4.4. Pruebas comparativas respecto a actividad antihelmíntica de dosis únicas fármaco/inhibidor frente a la administración de 3 dosis consecutivas.**

5.4.4.1 Efecto de la asociación albendazol/ metimazol<sup>R</sup>.

5.4.4.2 Efecto de la asociación albendazol/ metirapona<sup>R</sup>.

Ambas experiencias se realizaron sobre la fase emigrante enquistada del ciclo biológico de T. spiralis, es decir, los animales se trataron en los días 14 p.i.(dosis única) y 13, 14 y 15 p.i.(dosis repetida, tres días consecutivos), en el caso de larvas emigrantes los días 35 p.i.(dosis única) y 34, 35 y 36 p.i. (3 días de tratamiento). La determinación de la eficacia se realizó en el día 45 p.i.(larvas emigrantes) y día 46 p.i (larvas enquistadas).

## 5.5 POTENCIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DE ALBENDAZOL, MEDIANTE EL USO CONJUNTO DE DOS RECURSOS FARMACOTECNICOS.

Para producir una mejora en la actividad antiparasitaria del albendazol y dado que poseemos información tanto, del perfil farmacocinético y farmacológico de las formulaciones de éste, como de su administración conjunta con distintos inhibidores de su metabolismo microsomal hepático, en nuestro modelo experimental, se creyó interesante combinar ambos recursos farmacotécnicos para mejorar la posología, intentando disminuir la dosis eficaz.

Se eligió la solución líquida de albendazol / transcutol 1:40 administrado a la dosis de 25 mg/kg, conjuntamente con los inhibidores metimazol<sup>R</sup> y metirapona<sup>R</sup> a las dosis de 1,5 mg/kg y 20 mg/kg, respectivamente en pruebas separadas. Para ello se diseñaron las siguientes experiencias:

### 5.5.1 Efecto de la asociación SIGEN-ABZ / MTZ y SIGEN-ABZ / MTP en larvas emigrantes de T.spiralis.

### 5.5.2 Efecto de la asociación SIGEN-ABZ / MTZ y SIGEN-ABZ / MTP en larvas enquistadas de T.spiralis.

En ambas experiencias el modelo a seguir fue el mismo a excepción del período de tiempo durante el cual se administraban los fármacos: - Días 13, 14 y 15 p.i, (previo administración del tratamiento supresor el día 9 p.i) en el caso de larvas emigrante y días 34, 35 y 36 p.i, en larvas enquistadas.

El sacrificio de los animales y recuento de larvas para la obtención de resultados , se realizó en los días 30 p.i, para larvas emigrantes y día 45 p.i, para larvas enquistadas.



# RESULTADOS



## 6.1. ALBENDAZOL COMO MATERIA PRIMA.

### 6.1.1 Actividad antiparasitaria.

#### 6.1.1.1 Experiencias sobre la fase de preadultos.

Las tablas 5 y 6, recogen los resultados obtenidos del tratamiento de T. spiralis, durante la fase intestinal, con dos muestras de albendazol suministrados por dos proveedores diferentes; - SKF-ABZ (tabla 5) dosis únicas y GEN-ABZ (tabla 6), administrado en dosis únicas y fraccionadas.

En todos los casos y tanto en el lote testigo como en los problemas, se realizó el recuento de gusanos adultos recuperados de intestino delgado, determinándose la media aritmética, desviación estandar y eficacia expresada como; porcentaje de reducción de adultos recuperados en los lotes problema, con respecto al testigo. La significación estadística de estos porcentajes de reducción se determinó previo calculo de la t-Student, considerándose significativos aquellos porcentajes con valor de p inferior a 0,05.

En el tratamiento de preadultos de T. spiralis con dos sustancias que suponemos bioequivalentes se encontró que el albendazol denominado por nosotros genérico, fue significativamente menos activo que el albendazol patrón cuando ambos se administran en dosis únicas. Sin embargo GEN-ABZ administrado en dosis fraccionadas alcanzó una eficacia del 99 %, similar a la que se obtiene al administrar una dosis única de SKF-ABZ de 10 mg/kg.

Nº ratón	CONTROL	SKF-ABZ 10 mg/kg	SKF-ABZ 5 mg/kg	SKF-ABZ 2,5 mg/kg
1	150	5	23	99
2	114	2	58	88
3	95	7	54	86
4	80	2	30	84
5	80	0	40	85
6	105	5	35	63
7	94	3	44	60
8	94	2	42	105
X	101,5	3,25	40,75	83,75
D.S	24,4	2,3	12,32	16,74
% R		96,79	59,85	17,6
t-St		10,51	5,74	5,74
p		< 0,0001	< 0,0001	> 0,05

**TABLA 5 :** Efecto de la administración de SKF-ABZ sobre preadultos de *T. spiralis* a las 24 h p.i, en dosis únicas.

SKF-ABZ = albendazol patrón suministrado por Smithkline Beecham Pharmaceuticals.

N° ratón	CONTROL	GEN-ABZ 10 mg/kg	GEN-ABZ 5 mg/kg	GEN-ABZ 5 mg/kg (\$)
1	202	68	78	0
2	140	99	109	0
3	192	78	107	0
4	190	30	64	0
5	159	63	140	0
6	192	86	190	0
7	160	50	108	1
8	202	45	109	0
9	182	103	90	0
10	161	30	-	0
x	178	65,2	110,5	0,11
D.S	6,76	8,36	12,27	0,11
% R		62,75	43,5	99,9
t-St		10,48	4,94	24,86
p		< 0,05	< 0,05	< 0,05

**TABLA 6.** Efecto de la administración oral de GEN-ABZ sobre la fase de maduración de *T. spiralis*, a las 24h p.i cuando la toma se realizaba en dosis únicas y a las 20, 24 y 28 h p.i, en dosis fraccionadas (\$).

GEN-ABZ = albendazol genérico suministrado por Chemo Ibérica s.a

### 6.1.1.2 Experiencias sobre la fase migratoria.

Los resultados obtenidos del tratamiento de larvas emigrantes de T.spiralis. (días 13, 14 y 15 p.i),. con SKF-ABZ , GEN-ABZ y GEN\*-ABZ, a las dosis únicas de 50 mg/kg y 100 mg/kg, se exponen en las tablas 7, 8 y 9.

En todos los casos se realizó el recuento de larvas vivas y muertas, determinándose la eficacia en función del porcentaje de reducción de larvas totales recuperadas, respecto a los testigos correspondientes. El porcentaje de larvas muertas en cada lote experimental, se calculó según la siguiente fórmula:  $(n^{\circ} \text{ l. muertas} / \text{l. totales}) \times 100$

En esta fase del ciclo biológico de T.spiralis el albendazol patrón mostró una mayor actividad.

N° Animal	CONTROL		SKF-ABZ 100mg/kg		SKF-ABZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	5994	114552	2664	49284	4662	43956
2	11988	131868	666	45288	0	39960
3	11980	103896	1332	31968	1332	89244
4	6660	75924	1998	26640	1998	53280
5	1332	87912	3330	21312	0	25308
6	19980	79920	0	26640	3996	59940
7	1998	69264	4662	33522	3996	79920
8	13320	94763	Nd	Nd	666	54612
X	9156,5	94763	2091,74	33522	2080	55777,5
D.S	59073,3	22818,7	1605	11252,6	1898	20860,49
%R				64		41,14
%M	9,2		6,2		3,7	
t-St			1,37	5,9	1,476	3,457
P			< 0,05	< 0,0001	< 0,05	< 0,005

**TABLA 7.** Efecto de SKF-ABZ sobre larvas emigrantes de *T. spiralis*.: Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i, sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i.

SKF-ABZ = albendazol suministrado por Smithkline Beecham

Nd= No determinado.

N° Animal	CONTROL		GEN-ABZ	100mg/kg	GEN-ABZ	50mg/kg
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	5994	114552	7992	60720	6660	64350
2	11988	131868	5994	79200	2664	47520
3	11980	103896	11988	52800	10656	76560
4	6660	75924	19980	53460	0	68310
5	1332	87912	11980	79200	3396	77220
6	19980	79920	6660	40920	3396	65792
7	1998	69264	3996	48015	1998	52800
8	13320	94763	17316	35640	Nd	Nd
X	9156,5	94762,4	10738,2	56244,4	4110	64650,3
D.S	5907,3	21126	5655,8	16127,5	3506	11169,1
% R				40,6		29,5
t-ST			0,901	4,09	1,249	3,37
P			> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,005
% M	9,2		19,092		6,3	

**TABLA 8.** Efecto de GEN-ABZ sobre larvas emigrantes de *T. spiralis*. Tratamiento el los días 13, 14, 15 p.i, sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i.

GEN-ABZ = albendazol suministrado por Chemo Ibérica.

Nd = no determinado.

N° Animal	CONTROL		GEN*-ABZ 100mg/kg		GEN*-ABZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1		67932		45288		78588
2		87912		61272		63936
3		46620		33300		86580
4		111888		74592		59940
5		111888		46620		73260
6		69264		70596		53280
7		69264		29304		75924
8		113220		31968		Nd
<b>X</b>		84748,5		49117,5		70215,4
<b>D.S</b>		25382,3		17791,58		11630
<b>% R</b>				42,04		17,14
<b>t-ST</b>				3,25		1,3876
<b>P</b>				< 0,005		> 0,05
<b>% M</b>						

**TABLA 9.** Efecto de GEN\*-ABZ sobre larvas emigrantes de *T. spiralis*.: Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i.

GEN\*-ABZ = albendazol suministrado por Chemo Ibérica(lote 2).

Nd = no determinado

### 6.1.1.3 Experiencias sobre la fase muscular

En las tablas 10, 11 y 12, se reflejan los resultados obtenidos del tratamiento de larvas enquistadas de T. spiralis con el albendazol patrón (SKF-ABZ) y dos albendazoles genéricos (GEN-ABZ y GEN<sup>\*</sup>-ABZ), a las dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, administrados en dosis únicas los días 34,35 y 36 p.i.

Contra larvas enquistadas el GEN-ABZ no mostró ninguna actividad en contraste con SKF-ABZ (94,79 % de reducción cuando se administró a dosis de 100 mg/kg). La actividad antihelmíntica de un segundo lote de albendazol genérico "GEN<sup>\*</sup>-ABZ" se mostró mas acorde con los resultados obtenidos tras la administración de SKF-ABZ, a la dosis de 50 mg/kg (37 % y 33 % de reducción, respectivamente para ambos productos).

Se cuestiona la existencia de formas cristalinas inactivas en la muestra de GEN-ABZ.

N° Animal	CONTROL		SKF-ABZ 100mg/kg		SKF-ABZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	1998	127872	0	3996	0	77992
2	0	113886	2497	12487	0	76923
3	999	89910	1998	1998	3996	91908
4	0	93906	1498	3495	999	34965
5	999	76923	0	0	0	29970
6	1998	82917	1998	6993	1998	59940
7	0	51948	0	4995	1998	62937
8	0	108891	Nd	Nd	0	60939
X	749,25	93281,6	994,7	4852,2	999	61938
D.S	885,5	23784,57	1155,4	4024,1	1510,3	21158
%R				94,79		33,6
%M	0,8		20,49		1,6	
t-St			- 0.31	9,6718	- 0,4	2,3874
P			> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,05

**TABLA 10.** Efecto de SKF-ABZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*: Tratamiento en los días 34, 35, 36 p.i sacrificio y recuento de larvas día en el 46 p.i. SKF-ABZ = albendazol suministrado por Smithkline Beecham Pharmaceutical. Nd = no determinado.

N° Animal	CONTROL		GEN-ABZ 100mg/kg		GEN-ABZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	1998	49830	1998	50160	0	37785
2	0	49500	0	9240	0	60060
3	999	32835	999	35640	666	23760
4	0	48345	1332	42900	999	54120
5	999	47190	0	47190	999	58740
6	1998	55400	999	52965	1998	52140
7	0	47355	1998	41580	0	34650
8	0	37290	1332	39600	0	58080
X	749,2	43830,56	1082,2	39909,4	707,6	47416,88
D.S	885,5	3122,912	770,7	4816,64	879	4889,158
%R				8,9		-
%M	1,7		2,7		1,49	
t-St			- 0,80	0,698	0,943	0,641
P			> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

**TABLA 11** Efecto de GEN-ABZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*: Tratamiento en los días 34, 35, 36 p.i, sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i. GEN-ABZ = albendazol suministrado por Chemo Ibérica s.a.

N° Animales	CONTROL		GEN*-ABZ 100mg/kg		GEN*-ABZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1		81252		90576		62947
2		81252		15984		31968
3		95904		13320		53946
4		70596		53280		94905
5		127872		57276		49970
6		77256		79920		52947
7		127879		15984		78590
8		94583		37296		65934
X		94574,3		45454,5		59405,4
D.S		22198,9		29907,03		19431,9
% R				51,9		37
t-ST				3,7302		
P				<0,005		
% M						

TABLA 12. Efecto de GEN\*-ABZ sobre larvas enquistadas de T.spiralis: Tratamiento en los días 34, 35, 36 p.i, sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i. GEN\*-ABZ = albendazol suministrado por Chemo Ibérica(lote 2).



## 6.2. ALBENDAZOL SULFOXIDO " RICOBENDAZOL".

### 6.2.1 Bioequivalencia.

#### 6.2.1.1 Experiencias sobre la fase o estado de adultos.

La tabla 13, recoge los resultados obtenidos del tratamiento de T. spiralis, durante la fase intestinal, con dos muestras de ricobendazol suministrados por dos proveedores diferentes; - RBZ y RBZ\* fueron administrados a las dosis de 40, 20 y 10 mg/kg, fraccionadas en dos tomas, con un intervalo de 6 horas entre cada toma.

En todos los casos y tanto en el lote testigo como en los problemas, se realizó el recuento de gusanos adultos recuperados de intestino delgado (día 8 p.i), determinándose la media aritmética, desviación estándar y eficacia expresada como porcentaje de reducción de adultos recuperados en los lotes problema con respecto al testigo. La significación estadística de estos porcentajes de reducción se determinó previo calculo de la t-Student, considerándose significativos aquellos porcentajes con valor de p inferior a 0,05.

Tabla 13.

	Control	Dosis RBZ (mg/kg)			Dosis RBZ* (mg/kg)		
		10	20	40	10	20	40
<b>X</b>	111,2	62,12	53,12	61,0	48,5	47,66	50,12
<b>D.S</b>	26,97	24,04	27,2	13,52	22,44	17,84	11,83
<b>% R</b>	-	44,1	52,2	45,1	56,3	57,1	54,9
<b>T-St</b>	-	3,93	4,41	4,48	5,17	5,11	5,9
<b>p</b>	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

## 6.2.2 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA.

No se encontró diferencia en cuanto a eficacia antihelmíntica entre ambos lotes de ricobendazol ( $p > 0,05$ ), por lo que en pruebas sucesivas hicimos referencia únicamente al ricobendazol suministrado por Robert Young and Co. denominado por nosotros RBZ.

### 6.2.2.1 Experiencias sobre la fase de preadultos.

La tabla 14, recoge los resultados obtenidos del tratamiento de T. spiralis durante la fase intestinal, con ricobendazol "RBZ" en dosis únicas

En todos los casos y tanto en el lote testigo como en los problemas, se realizó el recuento de gusanos adultos recuperados de intestino delgado, determinándose la media aritmética, desviación estandar y eficacia expresada como porcentaje de reducción de adultos recuperados en los lotes problema con respecto al testigo. La significación estadística de estos porcentajes de reducción se determinó previo calculo de la t-Student, considerándose significativos aquellos porcentajes con valor de p inferior a 0,05.

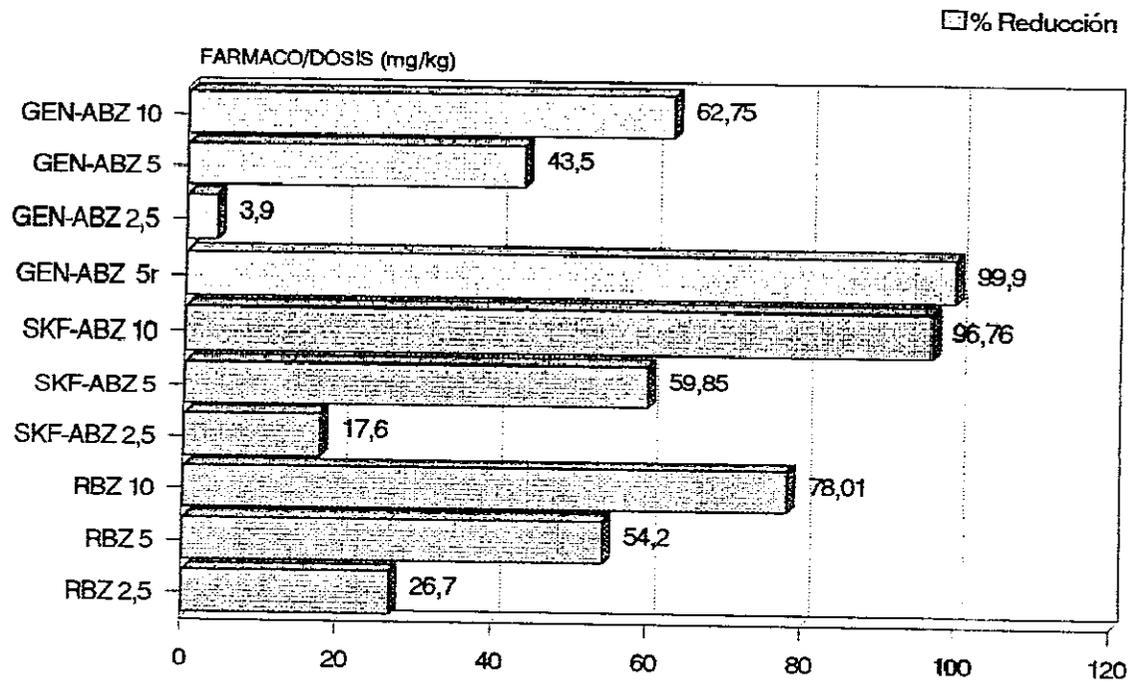
En la gráfica 12 se representa la eficacia comparada, expresada en porcentaje de reducción de GEN-ABZ y SKF-ABZ y RBZ, aplicados sobre la fase de preadultos de T. spiralis (24 h p.i.).

N° animal	CONTROL	RBZ 10mg/kg	RBZ 5 mg/kg
1	202	30	111
2	140	57	102
3	192	20	51
4	190	60	64
5	159	48	75
6	160	51	104
7	202	29	59
8	182	18	86
9	192	-	-
10	161	-	-
x	178	39,125	81,5
D.S	6,76	5,93	8,02
% R		78,01	54,2
t-St		15	9,25
p		< 0,05	< 0,05

**TABLA 14:** Efecto de la administración oral de ricobendazol (RBZ) sobre la fase de preadultos de T. spiralis, a las 24 h p.i., en dosis únicas.

Figura 12. Eficacia comparada de GEN-ABZ, SKF-ABZ y RBZ.

Preadultos *T. spiralis*.



GEN-ABZ= albendazol genérico

SKF-ABZ= albendazol patrón

RBZ = ricobendazol.

### 6.1.1.2 Experiencias sobre la fase migratoria.

Los resultados obtenidos del tratamiento de larvas emigrantes de T. spiralis, (días 13, 14 y 15 p.i.), con RBZ, a las dosis únicas de 50 mg/kg y 100 mg/kg, se exponen en la tabla 15.

En todos los casos se realizó el recuento de larvas vivas y muertas, determinándose la eficacia en función del porcentaje de reducción de larvas totales recuperadas respecto a los testigos correspondientes.

El porcentaje de larvas muertas en cada lote experimental, se calculó según la siguiente fórmula:  $(n^{\circ} \text{ l. muertas} / \text{l. totales}) \times 100$

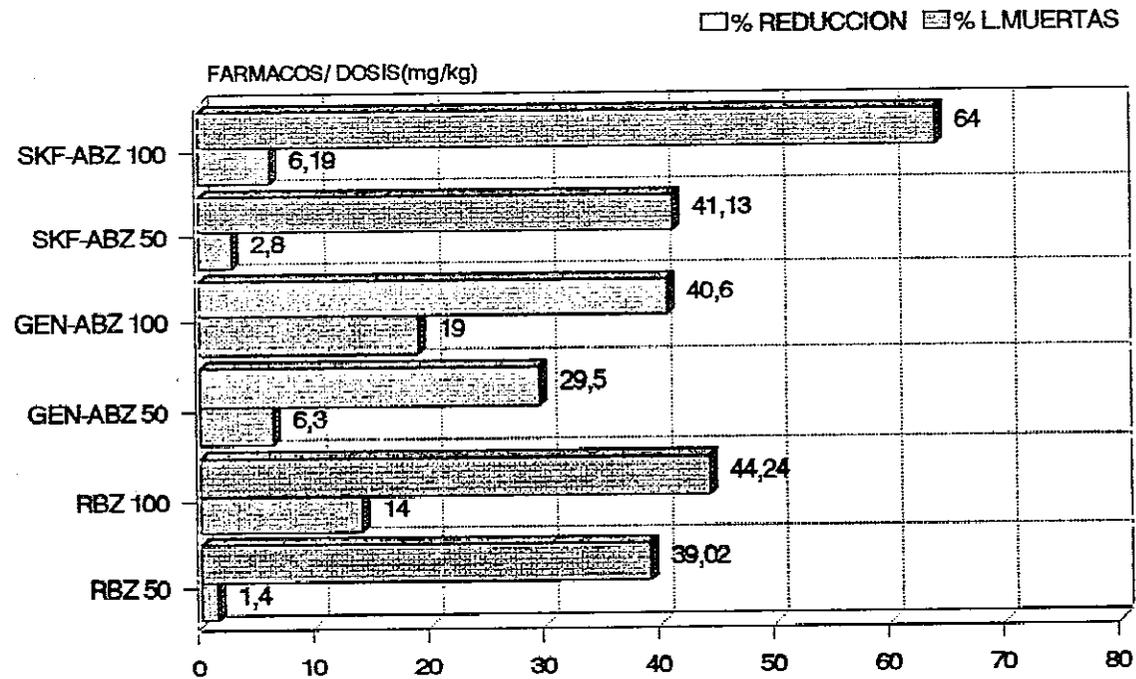
En la figura 13 se muestra las actividades farmacológicas comparadas correspondientes al tratamiento de larvas emigrantes de T. spiralis, con GEN-ABZ, SKF-ABZ y RBZ, expresando la eficacia como porcentaje de reducción de larvas recuperadas respecto al control.

N° Animal	CONTROL		RBZ 100mg/kg		RBZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	0	62938	10656	49950	666	35631
2	333	77922	4995	48275	1332	45621
3	1332	64612	8991	18648	0	35298
4	333	65934	6993	26640	1332	38628
5	333	95238	5661	39294	0	19368
6	0	68934	1665	36630	0	33300
7	333	75604	1665	40940	666	39294
8	333	50283	2664	39094	0	57276
9	333	58941	Nd	Nd	1332	61276
X	370,005	68934	5411,25	38433,8	592	42032
D.S	388,5	4295,5	3352,5	3952,52	618,02	3532,6
% R				44,24		39,02
% M	0,54		14,07		1,4	
t-St			- 4,49	5,17	- 0,91	4,83
p			< 0,001	< 0,05	> 0,05	< 0,05

**TABLA 15:** Efecto de RBZ sobre larvas emigrantes de *T. spiralis*. Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i. RBZ = ricobendazol Nd= no determinado.

Figura 13 ,Eficacia comparada de SKF-ABZ , GEN-ABZ y RBZ .

Larvas emigrantes *T.spiralis*



SKF-ABZ = albendazol patrón  
GEN-ABZ = albendazol genérico  
RBZ = ricobendazol.

### 6.2.2.3 Experiencias sobre la fase muscular

En la tabla 16, se reflejan los resultados obtenidos del tratamiento de larvas enquistadas de T. spiralis con ricobendazol, a las dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, administrados en dosis únicas, los días 34,35 y 36 p.i.

En la figura 14, se muestra la actividad farmacológica comparada de GEN-ABZ, SKF-ABZ y RBZ, expresada como porcentaje de reducción de larvas de T. spiralis recuperadas, respecto al control correspondiente.

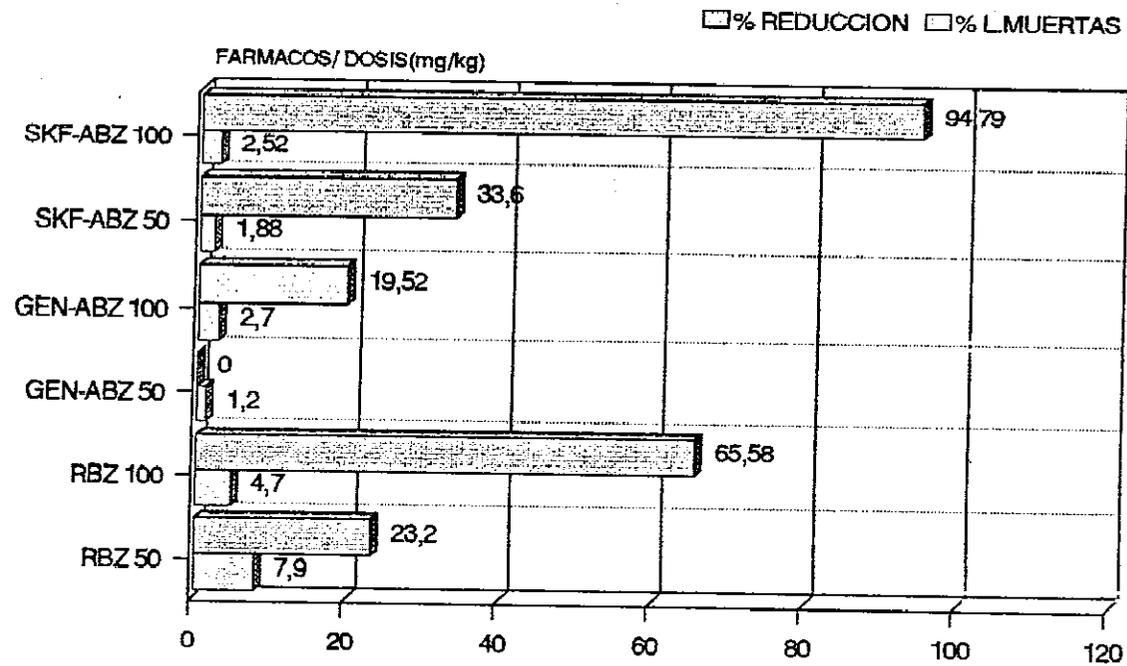
N° Ratón	CONTROL		RBZ 100mg/kg		RBZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	1998	49830	999	16830	10656	47520
2	0	49500	666	15130,8	4995	19635
3	999	32835	666	11055	5661	35640
4	0	48345	0	8415	0	23100
5	999	47190	0	19632	2664	46530
6	1998	55400	0	23100	0	23100
7	0	47355	0	34650	1332	34650
8	0	37290	1998	9240	666	33660
9	0	26730	666	5610	8325	38775
X	599,4	43830,56	765	15962,8	2664	33623,33
D.S	842,4	31122,9	801,2	9003,55	3485	3351,02
%R				65,58		23,2
%M	1,3		4,7		7,9	
t-St			- 0,45		- 1,82	2,228
P			> 0,05	< 0,0001	< 0,05	< 0,05

**TABLA 16:** Efecto de RBZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*: Tratamiento en los días 34, 35, 36 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i.

RBZ = ricobendazol

Figura 14. Eficacia comparada de SKF-ABZ , GEN-ABZ y RBZ .

Larvas enquistadas *T.spiralis*



SKF-ABZ = albendazol patrón  
GEN-ABZ = albendazol genérico  
RBZ = ricobendazol.

### 6.2.3 Estudio biofarmacéutico y farmacocinético del Ricobendazol.

La tabla siguiente muestra los resultados del estudio farmacocinético del ricobendazol administrado oralmente a ratones.

Ricobendazol 50 mg/kg					
T (h)	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )			C ( $\mu\text{g/ml}$ )	D.S
0.25	16.95	25.55	25.97	22.82	5.09
0.75	26.18	23.76	22.67	24.2	1.7
1.30	17.27	14.56	21.90	17.9	3.7
2.00	14.42	16.58	21.71	17.57	3.7
3.00	8.45	9.38	11.68	9.8	1.6
4.50	8.3	5.24	7.86	7.13	1.6
6.00	7.4	0.00	2.78	3.39	3.7

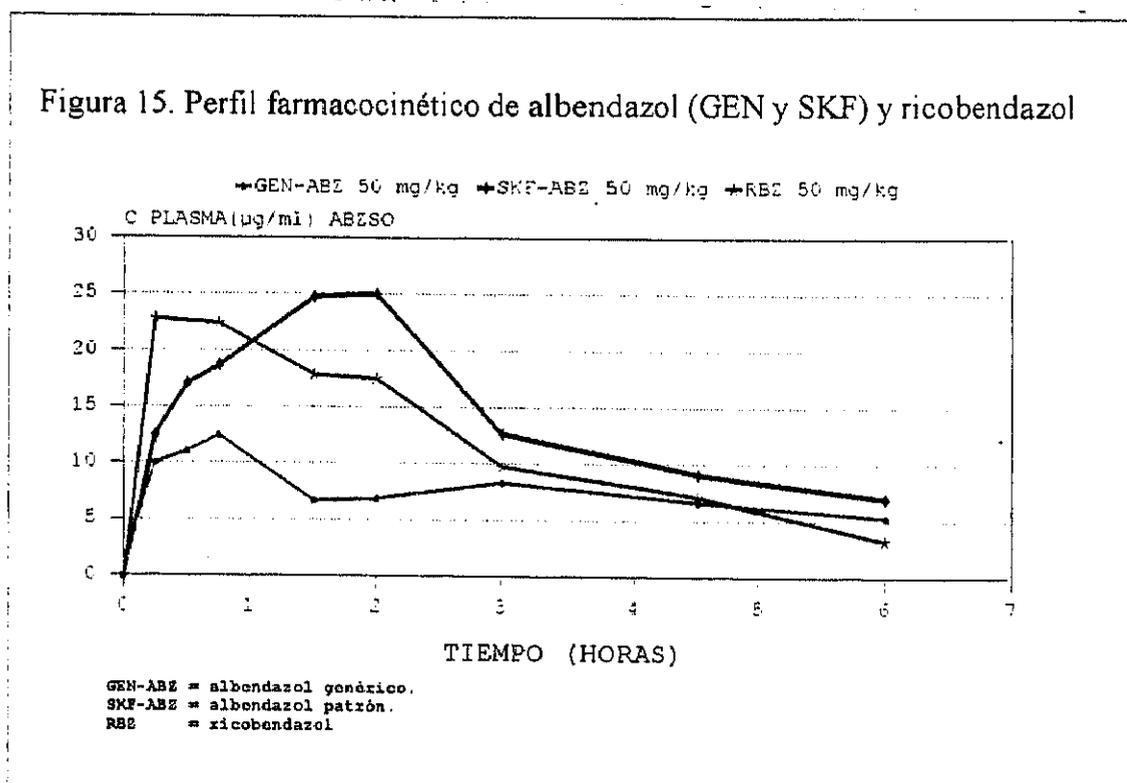
Concentraciones plasmáticas del albendazol sulfóxido ( $\mu\text{g/ml}$ ) para cada ratón en un tiempo dado, junto con el valor medio (C) y desviación estándar (D.S), tras la administración oral de ricobendazol.

En la tabla siguiente se recogen los resultados medios y desviación estándar de los siguientes parámetros farmacocinéticos (  $T_{\text{max}}$ ,  $C_{\text{max}}$ ,  $ABC_{0-6h}$ ), determinados para ricobendazol.

FORMULACION	$T_{\text{max}}$ (h)	$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$ABC(\mu\text{gh/ml})$
RBZ	0,41 (0,28)	25,9 (0,3)	70,62

La constante de eliminación y semivida de eliminación no fue posible determinarlas, ya que las concentraciones plasmáticas a  $t > 6$  horas se mantuvieron estables, posiblemente por un efecto del ciclo enterohepático, unión a proteínas plasmáticas o a un fenómeno de redistribución en tejidos.

En la figura 15 (concentraciones plasmáticas/tiempo) se muestra representado el perfil farmacocinético del ricobendazol, comparado con el perfil farmacocinético del albendazol.



### 6.3. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE LAS NUEVAS FORMULACIONES DESARROLLADAS.

#### 6.3.1 EXPERIENCIAS SOBRE EL ESTADO DE PREADULTOS.

##### 6.3.1.1 Eficacia de la dispersión sólida y solución líquida de GEN-ABZ.

Las tablas 17 y 18 recogen los resultados obtenidos en el tratamiento por vía oral de los preadultos de T. spiralis, durante su fase intestinal, con DsGEN-ABZ (tabla 17), y SIGEN-ABZ (tabla 18).

En todos los casos y tanto en el lote testigo como en los tratados con cada formulación, se realizaba el recuento de adultos totales, determinándose la media aritmética, desviación estándar, porcentaje de reducción del total de adultos recuperados en los lotes problema, con respecto al testigo de la experiencia.

La significación estadística se determinó previo cálculo de la t-Student, considerándose no significativos aquellos porcentajes con valor de p superior a 0,05.

Nº Animal	CONTROL	DsGEN-ABZ 10 mg/kg	DsGEN-ABZ 5 mg/kg	DsGEN-ABZ 2,5 mg/kg
<i>1</i>	202	85	65	100
<i>2</i>	192	16	74	117
<i>3</i>	159	10	53	120
<i>4</i>	192	12	93	150
<i>5</i>	160	28	43	148
<i>6</i>	140	45	74	110
<i>7</i>	190	34	59	120
<i>8</i>	182	14	48	95
<i>9</i>	161	13	-	78
<i>10</i>	202	-	-	-
<b>x</b>	178	29,66	63,62	115,33
<b>D.S</b>	6,76	7,84	5,80	7,80
<b>% R</b>		83,9	64,2	35,2
<b>t-St</b>		14,39	12,44	6,09
<b>p</b>		< 0,05	< 0,05	< 0,05

**TABLA 17:** Efecto de la administración oral de DsGEN-ABZ, sobre la fase de preadultos de T. spiralis, a las 24 h p.i, en dosis únicas.

DsGEN-ABZ = albendazol genérico formulado en dispersión sólida con kollindón<sup>R</sup> 12 (1:20).

Nº Animal	CONTROL	SIGEN-ABZ 10 mg/kg	SIGEN-ABZ 5 mg/kg	SIGEN-ABZ 2,5 mg/kg
1	112	0	0	0
2	62	0	0	0
3	84	0	0	0
4	87	0	0	0
5	72	0	0	0
6	103	0	0	0
7	94	0	0	0
8	70	0	0	0
x	85,5	0	0	0
D.S	17,15	0	0	0
% R		100	100	100
t-St		14,097	14,097	14,097
p		< 0,01	< 0,01	< 0,01

**TABLA 18:** Efecto de la administración oral de SIGEN-ABZ, sobre la fase de preadultos de *T.spiralis*, a las 24 h p.i, en dosis únicas.

SIGEN-ABZ = albendazol genérico, formulado en solución líquida con transcuto1<sup>R</sup>

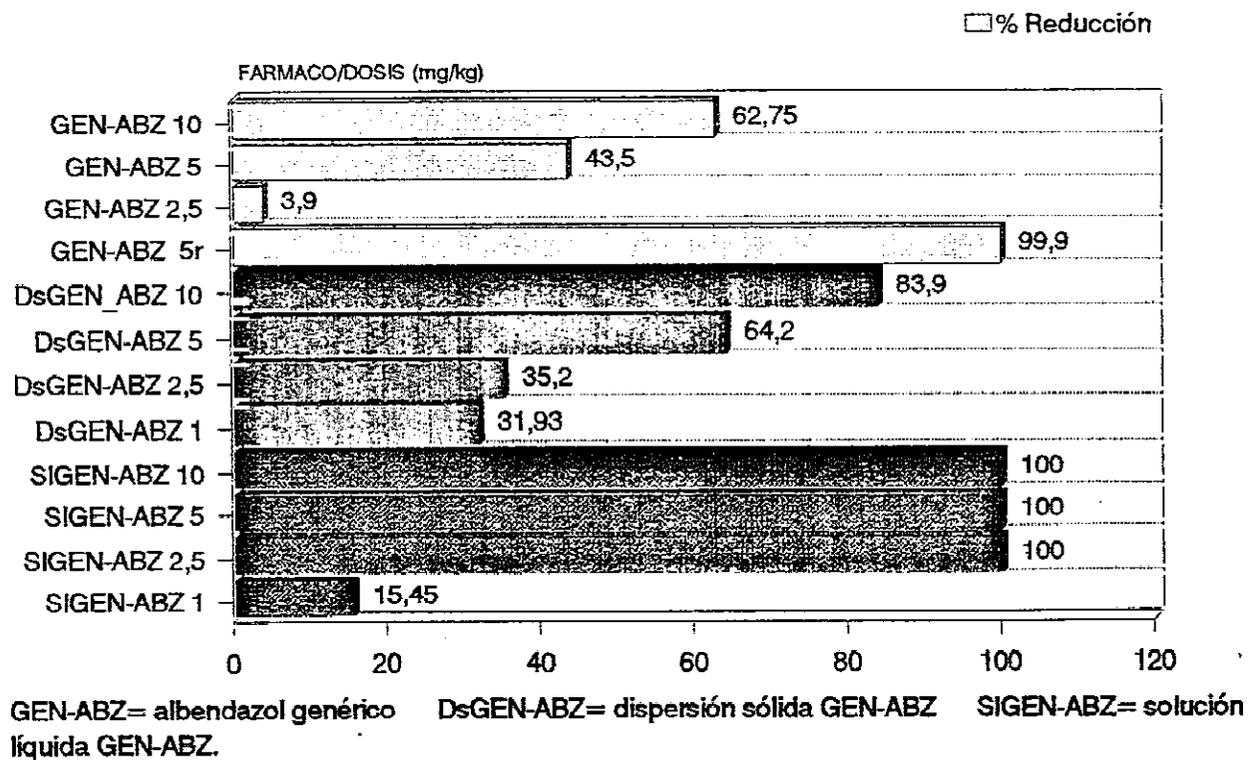
---

En la gráfica 16 se representa la eficacia , expresada en porcentajes de reducción de adultos recuperados de cada una de las formulaciones de GEN-ABZ, administradas sobre la fase de preadultos de T.spiralis , a las 24 horas p.i.

En el tratamiento de gusanos adultos de T.spiralis con bajas dosis de diferentes formulaciones de un albendazol genérico se puso de manifiesto que un albendazol genérico, preparado como dispersión sólida (DsGEN-ABZ) y solución líquida (SIGEN-ABZ), fue significativamente mas activo que el albendazol de partida, cuando ambos se administraban en dosis únicas. Sin embargo GEN-ABZ, administrado en dosis fraccionadas (5 mg/kg), aumentó significativamente su actividad igualándose al GEN-ABZ administrado como solución líquida(SIGEN-ABZ), formulación altamente eficaz. (100% de eficacia a la dosis de 2,5 mg/kg).

Para determinar la eficacia límite de GEN-ABZ y sus formulaciones se administraron GEN-ABZ 2,5 mg/kg, DsGEN-ABZ y SIGEN-ABZ 1 mg/kg, obteniendo eficacias de 3,9 % ( $p > 0,05$ ) 31,9 % ( $p < 0,001$ ) y 15,45 % ( $p > 0,05$ ), respectivamente.

**Figura 16. Eficacia comparada de GEN-ABZ y sus formulaciones. Preadultos *T.spiralis***



### 6.3.1.2 Eficacia de la solución líquida y dispersión sólida de SKF-ABZ.

Las tablas 19, 20 recogen los resultados de la actividad antiparasitaria de la DsSKF-ABZ (tabla 19), y SISKF-ABZ (tabla 20), tras la administración oral a ratones infestados con T. spiralis, en su fase de preadultos.

Los parámetros determinados fueron los mismos que en el punto 6.3.1.1.

En la gráfica 17, se representa la eficacia expresada en % de reducción de adultos recuperados por efecto de cada una de las formulaciones de SKF-ABZ, sobre el estado de preadultos (24 horas p.i.).

La solución líquida de SKF-ABZ resultó ser la más eficaz, 100% a la dosis de 2,5 mg/kg, esta misma eficacia (95,68 %) se alcanza con la dispersión sólida (DsSKF-ABZ) cuando se administraba a la dosis de 5 mg/kg. SKF-ABZ resultó ser menos eficaz.

La administración de dosis inferiores de estos fármacos produjeron eficacias de un 17,6 % ( $p > 0,05$ ), para dosis de 2,5 mg/kg de SKF-ABZ, 34,06 % ( $p < 0,01$ ) y 24,65 % ( $p > 0,05$ ), para las dosis de 1 mg/kg de DsSKF-ABZ y SISKF-ABZ, respectivamente

N° Animal	CONTROL	DsSKF-ABZ 10 mg/kg	DsSKF-ABZ 5 mg/kg	DsSKF-ABZ 2,5 mg/kg
1	85	0	5	91
2	135	0	7	31
3	129	0	2	70
4	146	0	42	109
5	137	9	9	40
6	85	0	1	67
7	95	0	2	85
8	140	0	9	40
x	115,25	1,1250	9,625	66,62
D.S	24,68	3,1820	13,45	27,84
% R		100	95,68	48,56
t-St		12,96	10,625	3,69
p		< 0,01	< 0,01	< 0,01

**TABLA 19 :** Efecto de la administración oral de DsSKF-ABZ, sobre la fase de preadultos de *T. spiralis*, a las 24 h p.i en dosis únicas.

DsSKF-ABZ= albendazol patrón, formulado en dispersión sólida con kollindón<sup>R</sup> 12 (1:20).

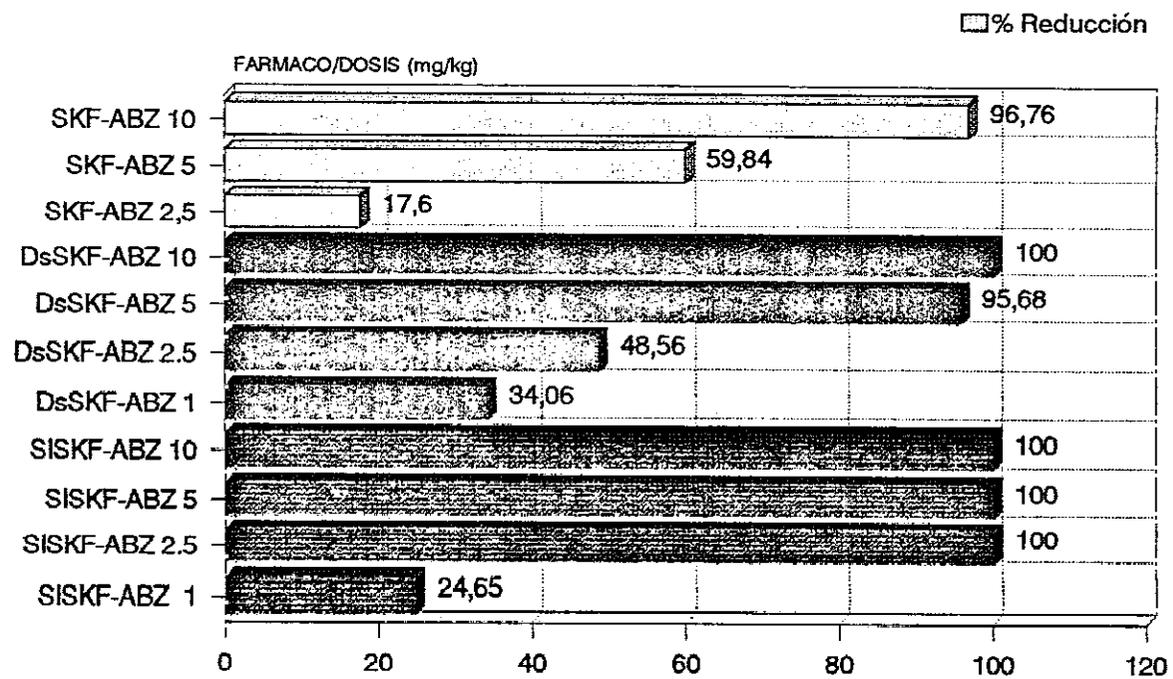
Nº Animal	CONTROL	SISKF-ABZ 10 mg/kg	SISKF-ABZ 5 mg/kg	SISKF-ABZ 2,5 mg/kg
1	85	0	0	0
2	135	0	0	0
3	129	0	0	0
4	146	0	0	0
5	137	0	0	0
6	85	0	0	0
7	95	0	0	0
8	140	0	0	0
x	115,25	0	0	0
D.S	24,68	0	0	0
% R		100	100	100
t-St		13,205	13,205	13,205
p		< 0,01	< 0,01	< 0,01

TABLA 20 : Efecto de la administración oral de SISKF-ABZ, sobre la fase de preadultos de T. spiralis, a las 24 h p.i, en dosis únicas.

SISKF-ABZ= albendazol patrón, formulado en solución líquida con transcuto<sup>1</sup>R

Figura 17. Eficacia comparada de SKF-ABZ y sus formulaciones.

Preadultos *T.spiralis*



SKF-ABZ= albendazol patrón

DsSKF-ABZ= dispersión sólida SKF-ABZ.

SISKF-ABZ =solución líquida SKF-ABZ.

### 6.3.1.3 Eficacia de la solución líquida y dispersión sólida de ricobendazol.

Las tablas 21 y 22 recogen los resultados de la administración oral de las nuevas formulaciones de ricobendazol: DsRBZ (tabla 21) y SIRBZ (tabla 22), a ratones infestados con  $300 \pm 50$  larvas de *T. spiralis*, cuando éstos se encuentran ubicados en el intestino.

Los parámetros determinados fueron los mismos que en el punto 6.3.1.1.

En la gráfica 18 se expresa la eficacia comparada de ricobendazol y sus formulaciones expresada, como % de reducción de adultos recuperados, respecto al control no tratado.

La dispersión sólida resultó ser la más eficaz ( 89,3 % de eficacia cuando se administra a la dosis de 5 mg/kg) respecto a un 64,28 % y un 54,2 % alcanzado por la solución líquida y ricobendazol, respectivamente administrados a igual dosis.

Ricobendazol administrado tanto como solución líquida o dispersión, muestra una eficacia de 100 % a la dosis de 10 mg/kg; con el ricobendazol como producto sólido, se alcanzó una eficacia significativamente menor (78 %).

La administración de 2,5 mg/kg de RBZ produjo una eficacia de un 26,7 % ( $p > 0,05$ ), mientras que la administración de 1 mg/kg de ambas formulaciones produjo una eficacia de 38,59 % ( $p < 0,05$ ) en el caso de DsRBZ y 32,42 % para SIRBZ ( $p < 0,05$ ).

N° Animal	CONTROL	DsRBZ 10 mg/kg	DsRBZ 5 mg/kg	DsRBZ 2,5 mg/kg
1	74	0	1	56
2	70	11	9	50
3	120	0	3	31
4	70	0	28	40
5	71	3	6	32
6	100	0	3	35
7	87	0	2	36
8	103	7	29	55
9	113	0	6	27
x	89,7	2,33	9,66	40,22
D.S	6,58	1,34	3,65	3,60
% R		97,43	89,3	53,55
t-St		13	10,63	6,59
p		< 0,05	< 0,05	< 0,05

**TABLA 21:** Efecto de la administración oral de DsRBZ, sobre la fase de preadultos de *T. spiralis*, a las 24 h p.i, en dosis únicas.

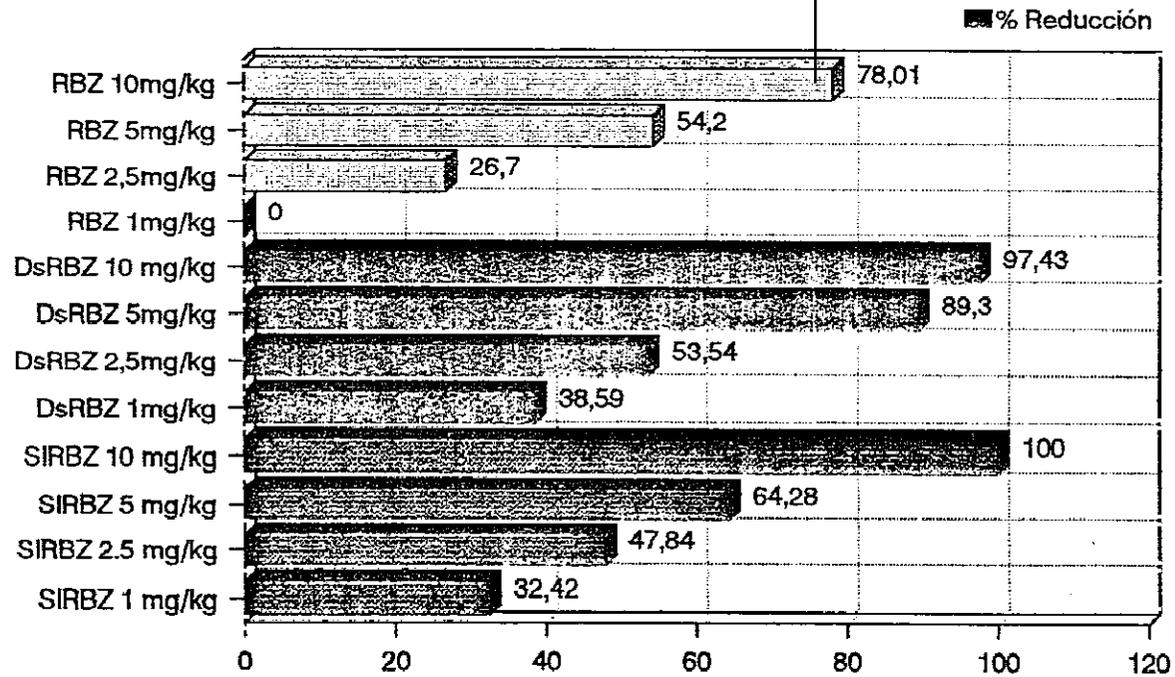
DsRBZ= ricobendazol, formulado en dispersión sólida con kollindón<sup>®</sup> 12 (1:20).

N° Animal	CONTROL	SIRBZ 10 mg/kg	SIRBZ 5 mg/kg	SIRBZ 2,5 mg/kg
1	85	0	48	85
2	135	0	67	62
3	129	0	31	43
4	146	0	40	82
5	137	0	21	54
6	85	0	35	62
7	95	0	48	44
8	140	0	40	52
x	115,25	0	41,25	60,5
D.S	24,68	0	13,687	15,85
% R		100	64,28	47,84
t-St		13,205	7,4152	152,781
p		< 0,01	< 0,01	< 0,01

**TABLA 22:** Efecto de la administración oral de SIRBZ, sobre la fase de preadultos de *T. spiralis*, a las 24 h p.i, en dosis únicas.

SIRBZ = ricobendazol, formulado en solución líquida con transcuto<sup>l</sup>R

Figura 18. Eficacia comparada de RBZ y sus formulaciones sobre preadultos de *T. spiralis*



RBZ = ricobendazol.

DsRBZ = dispersión sólida ricobendazol.

SIRBZ = solución líquida de ricobendazol

## 6.3.2 EXPERIENCIAS SOBRE LA FASE DE ASENTAMIENTO MUSCULAR.

### 6.3.2.1 Eficacia de GEN-ABZ formulado como dispersión sólida y solución líquida.

Las tablas 23 y 24 recogen los resultados obtenidos en el tratamiento, por vía oral, de larvas de T.spiralis durante su fase de asentamiento muscular, con DsGEN-ABZ (tabla 23) y SIGEN-ABZ (tabla 24).

En todos los casos y tanto en el lote testigo como en los tratados con cada formulación, se realizaba el recuento de larvas totales y muertas, determinándose la media aritmética, desviación estándar, porcentaje de reducción de larvas muertas con respecto al número total de aisladas en cada lote y % de reducción del total de larvas recuperadas en los lotes problema, con respecto al testigo correspondiente.

La significación estadística se determinó previo cálculo de la t-Student, considerándose no significativos aquellos porcentajes con valor de p superior a 0,05.

En la gráfica 19 se representa la eficacia comparada, expresada en porcentajes de reducción de las formulaciones ensayadas sobre la fase de asentamiento muscular de T.spiralis ( días 13, 14 y 15 p.i.).

El GEN-ABZ formulado en solución líquida( SIGEN-ABZ) y administrado a la dosis de 50 mg/kg, fue el mas activo tratamiento en esta fase del parásito; sin embargo no se observó un aumento significativo en la actividad de la dispersión sólida de GEN-ABZ, con respecto al albendazol administrado como producto sólido de partida.

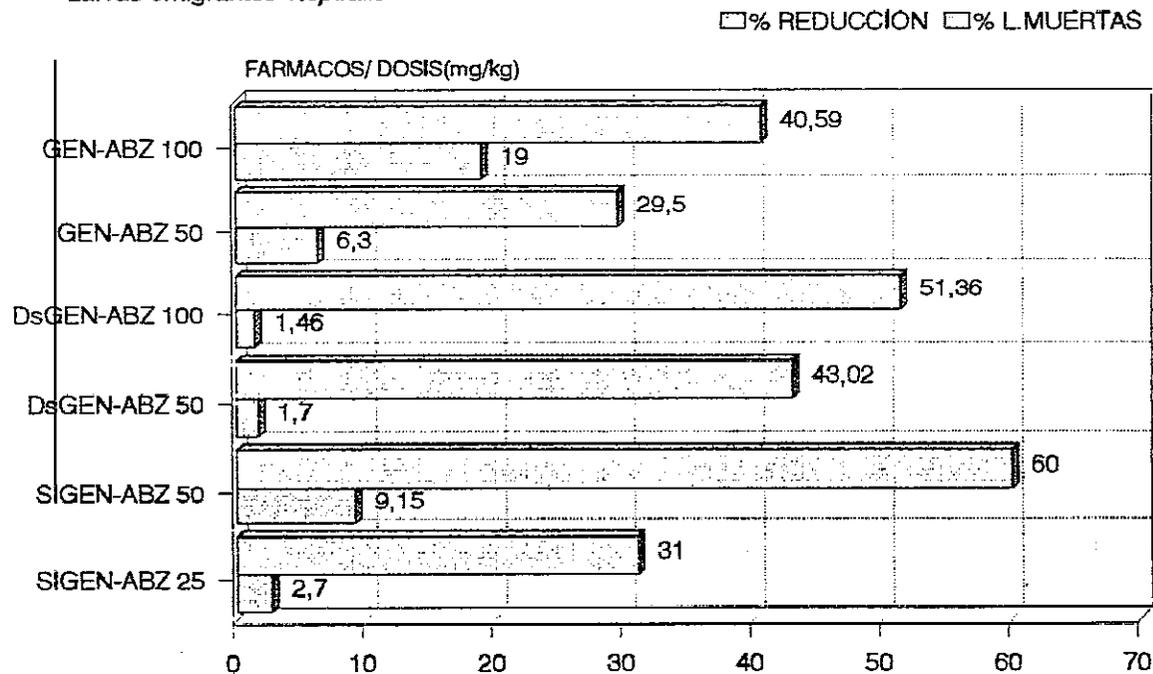
Nº Animal	CONTROL		DsGEN-ABZ 100 mg/kg		DsGEN-ABZ 50 mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	0	62938	666	16650	0	46620
2	333	77922	1332	33633	1332	40272
3	1332	64612	0	33633	1998	39606
4	333	65934	1332	17982	0	49950
5	0	95238	0	42952	666	25974
6	333	75604	333	31302	0	40272
7	333	50283	0	41958	1998	30636
8	333	58941	666	27306	0	40829,6
9	333	68934	0	56277	0	-
X	370	68934	581	33521,44	749,2	39269,95
D.S	388,5	12887	529,4	12488,13	903	7782,46
% R				51,37		43,03
% M	0,5		1,7		1,9	
t-St			- 0,67	5,9202	- 1,14	5,6479
P			> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,001

**TABLA 23:** Efecto de DsGEN-ABZ sobre larvas emigrantes de T. spiralis: Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i. DsGEN-ABZ = Dispersión sólida albendazol (suministrado por Chemo Ibérica.) / Kollindon<sup>R</sup> 12 .

Nº Animal	CONTROL		SIGEN-ABZ 50mg/kg		SIGEN-ABZ 25 mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	5994	114552	3996	52614	1998	78588
2	11988	131868	6660	31968	0	42624
3	11980	103896	10656	48951	6660	83916
4	6660	75924	2664	33300	1332	27972
5	1332	87912	0	16650	0	98568
6	19980	79920	0	23976	13320	54612
7	1998	69264	1332	33300	3996	70596
8	13320	94763	1998	57276	Nd	Nd
X	9157,6	94763	3413,25	372543	2913,7	65268
D.S	6314,7	22818,7	3655,4	14311,18	4775,3	24764,69
%R				60		31
%M	9,16		9,16		4,4	
t-St			2,22	5,93	2,23	2,317
P			> 0,05	<0,0001	> 0,05	<0,05

**TABLA 24:** Efecto de SIGEN-ABZ sobre larvas emigrantes de T. spiralis. Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i. SIGEN-ABZ = Solución líquida de albendazol genérico / Transcutol<sup>R</sup> (1:40). Nd = no determinado

Figura 19. Eficacia comparada de GEN-ABZ y sus formulaciones frente a Larvas emigrantes *T. spiralis*



GEN-ABZ = albendazol genérico.  
DsGEN-ABZ = dispersión sólida GEN-ABZ.  
SIGEN-ABZ = solución líquida GEN-ABZ.

### 6.3.2.2 Eficacia de SKF-ABZ formulado bajo solución líquida y dispersión sólida

Las tablas 25 y 26 recogen los resultados de la actividad antiparasitaria de la DsSKF-ABZ (tabla 25) y SISKF-ABZ (tabla 26), tras la administración oral a ratones infestados con T. spiralis, en su fase asentamiento muscular.

Los parámetros determinados fueron los mismos que en el punto 6.3.2.1.

En la gráfica 20 se representa la eficacia expresada en % de reducción de larvas de T. spiralis recuperadas respecto al control, de cada una de las formulaciones de SKF-ABZ, sobre el estado de migración (días 13, 14 y 15 p.i.), comparándolas con SKF-ABZ producto puro.

Al utilizar SKF-ABZ en forma de solución líquida o dispersión sólida, no se mejora significativamente la eficacia en comparación con el albendazol utilizado como producto sólido. Sin embargo debemos hacer la observación de que, tras el tratamiento con DsSKF-ABZ 100 mg/kg, del 48,99 % de larvas recuperadas respecto al total, un 81,37 % estaban muertas. Con la solución líquida administrada a la dosis de 50 mg/kg el porcentaje de larvas muertas fue de un 11% .

Nº Animal	CONTROL		DsSKF-ABZ 100mg/kg		DsSKF-ABZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	999	114885	11988	83916	4995	62937
2	0	162837	999	31968	4995	107892
3	0	93906	2997	79920	3996	115884
4	1998	132867	4995	56943	1998	83916
5	2997	99900	8991	48951	5994	96903
6	0	107892	999	50948	2997	78921
7	0	115884	999	55944	1998	51948
8	0	124875	5994	57942	0	69930
X	749,25	119130,7	4745,2	5831,6	3371,6	83541,4
D.S	1163,7	21689,05	4092,9	16758,58	1993,5	22190,6
%R				51,01		29,87
%M	0,6		81,37		4,03	
t-St			- 2,65	6,2756	-3,21	3,2441
P			< 0,01	< 0,001	< 0,005	< 0,005

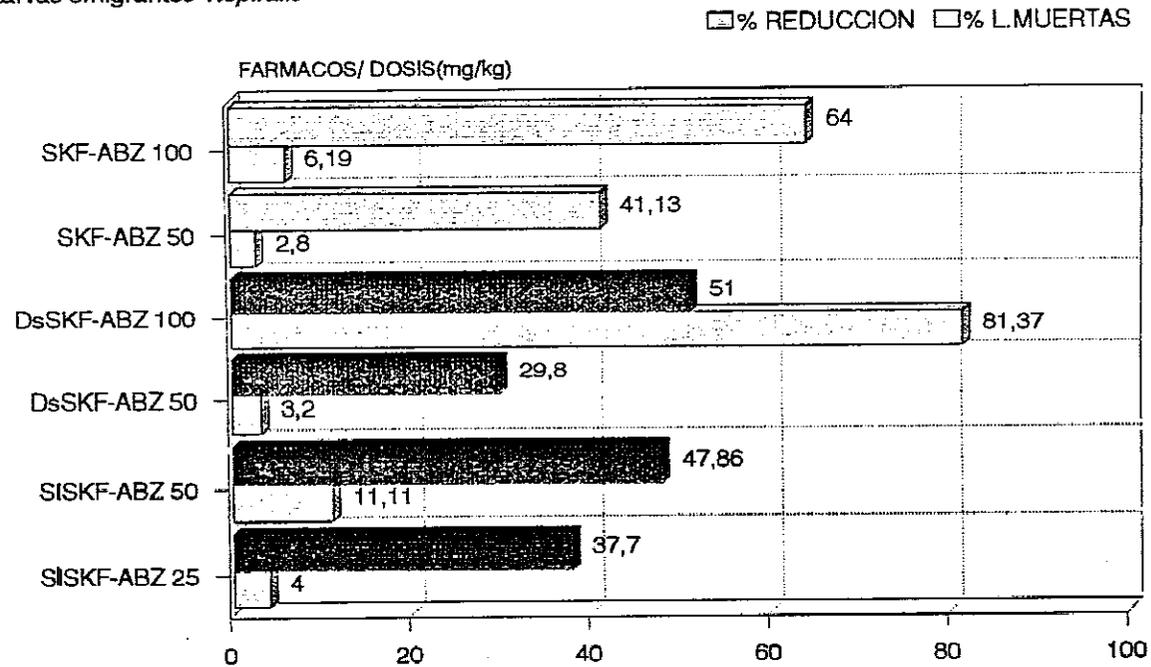
**TABLA 25:** Efecto de DsSKF-ABZ sobre larvas emigrantes de *T. spiralis*: Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i. DsSKF-ABZ = dispersión sólida de albendazol (Smithkline Beecham Pharmaceutical)/kollindón<sup>R</sup> 12.

Nº Animal	CONTROL		SISKF-ABZ 50mg/kg		SISKF-ABZ 25mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	1998	88911	999	27972	1998	25974
2	0	44955	4995	24975	0	33966
3	999	44955	0	38961	6993	16983
4	2997	41958	9990	24975	0	40959
5	0	72927	2997	17982	0	56943
6	0	49950	0	24975	1998	40959
7	999	39960	2997	29970	0	27972
8	1998	49950	*	*	0	25974
<b>X</b>	1123,8	54195,7	3139,7	28257,4	1373,6	33716,3
<b>D.S</b>	1124,8	17383,3	3528,6	7243,4	2443,39	12405,88
<b>%R</b>			47,86		37,7	
<b>%M</b>	2,0		11,11		4	
<b>t-St</b>			-1,53	3,6651	-0,26	2,7123
<b>P</b>			> 0,05	< 0,005	> 0,05	< 0,01

**TABLA 26:** Efecto de SISKF-ABZ sobre larvas emigrantes de *T. spiralis*: Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i. SKF-ABZ = Solución líquida de albendazol( Smithkline Beecham)/ Transcutol<sup>R</sup> (1:40).

Figura 20. Eficacia comparada de SKF-ABZ y sus formulaciones .

Larvas emigrantes *T. spiralis*



SKF-ABZ = albendazol patrón

DsSKF-ABZ= dispersión sólida SKF-ABZ

SISKF-ABZ= solución líquida SKF-ABZ.

### 6.3.2.3 Eficacia de RBZ formulado bajo solución líquida y dispersión sólida.

Las tablas 27 y 28 recogen los resultados de la administración oral de las nuevas formulaciones de ricobendazol: DsRBZ (tabla 27) y SIRBZ (tabla 28), a ratones infestados con  $300 \pm 50$  larvas de T. spiralis, cuando estos se encuentran en fase migratoria o fase de asentamiento muscular.

Los parámetros determinados fueron los mismos que en el punto 6.3.2.1.

En la gráfica 21 se expresa la eficacia comparada de RBZ y sus formulaciones, expresada como % de reducción de larvas totales recuperadas, respecto al control no tratado.

La administración de ricobendazol, en forma de solución líquida, produce un incremento de eficacia de un 23,37 % respecto al ricobendazol de partida y de un 41,29 % respecto a la dispersión sólida, cuando estos, se administraban a la dosis de 50 mg/kg. Cuando la formulación líquida se administra en dosis de 25 mg/kg, se alcanza una eficacia similar a la obtenida tras la administración de RBZ a 50 mg/kg. La administración de DsRBZ resultó menos eficaz.

N° Animal	CONTROL		DsRBZ	100mg/kg	DsRBZ	50mg/kg
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	3330	66600	3330	46620	0	71262
2	1998	70321	1998	23310	0	35298
3	1332	69930	0	41958	666	54612
4	0	65268	0	53280	0	46620
5	666	52614	1998	27306	1998	36630
6	1998	47286	6660	72594	1998	73260
7	0	77922	0	63936	3330	38961
8	1332	69930	Nd	Nd	5328	52947
X	1332	64983,8	1998	47000,6	1665	51198,75
D.S	1125,74	10097,5	2431	18055,3	1917	14831,18
% R				27,63		21,21
% M	2		4,2		3,2	
t-St			-0,69	2,42	- 0,42	2,1731
P			> 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05

**Tabla 27:** Efecto de DsRBZ sobre larvas emigrantes de T.spiralis. Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i.

DsRBZ = dispersión sólida de ricobendazol/ Kollindon<sup>R</sup> 12 (1:20).

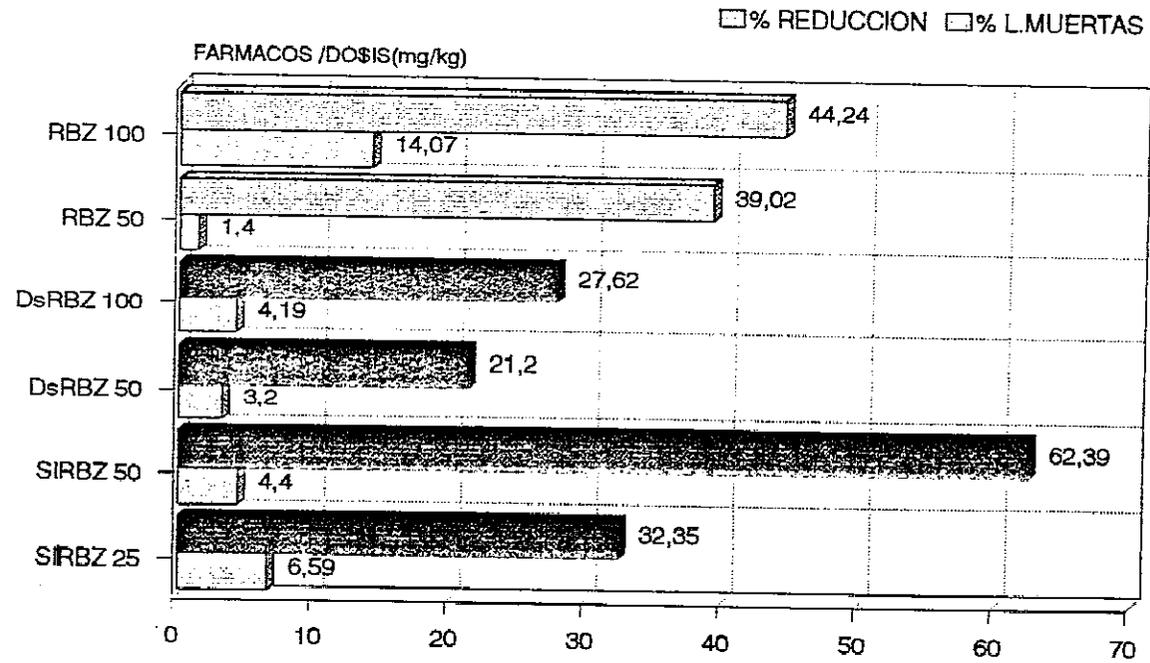
Nd = no determinado.

N° Animal	CONTROL		SIRBZ	50mg/kg	SIRBZ	25mg/kg
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	1998	39861	0	22977	9990	60939
2	0	47952	0	6993	10989	29970
3	999	53946	1998	5994	999	39960
4	2997	73962	0	10989	0	11988
5	0	35964	3996	23976	1998	40959
6	0	43956	999	9990	2997	15984
7	999	39960	0	32967	0	19980
8	1998	39960	6993	26973		-
x	1123,87	46828,12	1748,25	176073	3377,6	31397,14
D.S	1124,8		2546,9		4529	
% R				62,39		32,95
% M	2		4,4		6,6	
t-St			> 0,05		- 1,36	
p				0,0	> 0,05	> 0,0

Tabla 28 : Efecto de SIRBZ sobre larvas emigrantes de *T. spiralis*. Tratamiento en los días 13, 14, 15 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 30 p.i. SIRBZ = solución líquida de ricobendazol / transcuto<sup>R</sup> (1:40).

Figura 21. Eficacia comparada de RBZ y sus formulaciones.

Larvas emigrantes *T.spiralis*



RBZ = ricobendazol  
DsRBZ = dispersión sólida RBZ  
SIRBZ = solución líquida RBZ.

### 6.3.3. EXPERIENCIAS SOBRE LA FASE MUSCULAR.

#### 6.3.3.1 Eficacia del GEN-ABZ y de sus formulaciones.

Las tablas 29 y 30 recogen los resultados obtenidos en el tratamiento por vía oral, de ratones infestados con larvas de T. spiralis, durante la fase muscular, con DsGEN-ABZ (tabla 29) y SIGEN-ABZ (tabla 30).

En todos los casos y tanto en el lote testigo como en los tratados con cada formulación, se realizaba el recuento de larvas totales y muertas, determinándose la media aritmética, desviación estandar, porcentaje de reducción de larvas muertas con respecto al número total de aisladas en cada lote y % de reducción del total de larvas recuperadas en los lotes problema, con respecto al testigo correspondiente.

La significación estadística se determinó previo cálculo de la t-Student, considerándose no significativos aquellos porcentajes con valor de p superior a 0,05.

En algunas experiencias; se disponía de un testigo común, dado que los ensayos se llevaron a cabo paralelamente.

En la gráfica 22 se representa la eficacia, expresada en porcentajes de reducción, de las formulaciones ensayadas sobre la fase muscular de T. spiralis (días 34, 35 y 36 p.i.).

N° Animal	CONTROL		DsGEN-ABZ 100mg/kg		DsGEN-ABZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	1998	49830	666	37290	0	3960
2	0	49500	1998	49830	1332	42075
3	999	32835	0	46860	4662	48180
4	0	48345	999	14190	3330	33330
5	999	47190	1998	31020	0	43230
6	1998	37290	999	27555	0	41580
7	0	55400	0	35310	5328	35640
8	0	47355	0	10239	0	33000
9	0	26730	333	31020	0	38280
x	666	43830,56	777	31535,63	1628	35473,9
D.S	865,1	3122,9	798,5	4978,15	2211,6	4272,08
% R				28,18		10,03
% M	1,5		2,46		4,5	
t-St			- 0,28	2,143	- 1,2	1,579
p			> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05

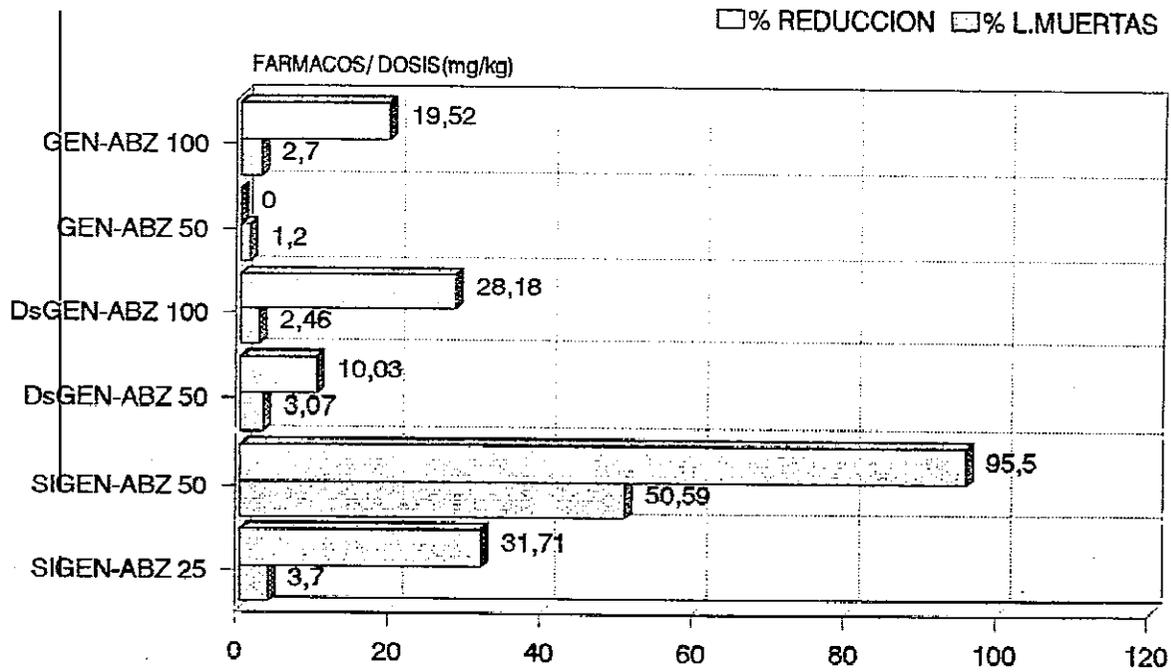
**TABLA 29:** Efecto de DsGEN-ABZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*. Tratamiento en los días 34, 35, 36 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i. DsGEN-ABZ = Dispersión sólida de albendazol genérico/ kollindon<sup>R</sup> 12 (1:20).

Nº Animal	CONTROL		SIGEN-ABZ 50 mg/kg		SIGEN-ABZ 25 mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	1998	127872	999	1998	4995	69930
2	0	113886	2997	10489,5	0	67932
3	999	89910	0	999	0	50949
4	0	93906	4995	9990	2497,5	57442,5
5	999	76923	4995	6993	2997	61938
6	1998	82917	2997	3996	3996	73926
7	0	51948	999	1998	*	*
8	0	108891	0	0	*	*
9	Nd	Nd	999	999	Nd	Nd
x	666	93281,7	1776	4162,5	2097,25	63686,25
D.S	865,1	23784,6	2045,9	4011,5	21309	8557,35
% R				95,5		31,72
% M	0,7		42,6		3,2	
t-St			- 1,49	11,1	- 1,80	2,8862
p			> 0,05	< 0,001	< 0,05	< 0,001

TABLA 30: Efecto de SIGEN-ABZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis* : Tratamiento en los días 34, 35, 36 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i. SIGEN-ABZ = solución líquida de albendazol (suministrado por Chemo Ibérica.) / transcuto<sup>l</sup>R.

Nd = no determinado \* = los ratones murieron tras el tratamiento

Figura 22. Eficacia comparada de GEN-ABZ y sus formulaciones.  
Larvas enquistadas *T.spiralis*



GEN-ABZ = albendazol genérico.  
DsGEN-ABZ = dispersión sólida GEN-ABZ.  
SIGEN-ABZ = solución líquida GEN-ABZ.

El GEN-ABZ formulado en solución líquida (SIGEN-ABZ) y administrado a la dosis de 50 mg/kg, fue el más activo en esta fase del ciclo del parásito (95,50 % de reducción); además del total de larvas recuperadas, un 50 % estaban muertas. Sin embargo, el incremento de actividad fue menor al administrar la dispersión sólida de GEN-ABZ (12,57 % de reducción a esta misma dosis); GEN-ABZ resultó ineficaz. Por otro lado, la solución líquida administrada a dosis de 100 mg/kg, resultó tóxica, produciendo la muerte de todos los ratones del lote, dato que no hemos considerado importante, ya que al administrarla a mitad de dosis (50 mg/kg), se alcanzó una eficacia de 95,5 % de reducción, en el número de parásitos recuperados.

### 6.3.3.2 Eficacia de SKF-ABZ formulado bajo solución líquida y dispersión sólida

Las tablas 31 y 32 recogen los resultados de la actividad antiparasitaria de la DsSKF-ABZ (tabla 31) y SISKF-ABZ (tabla 32), tras la administración oral a ratones infestados con T. spiralis, en su fase muscular.

Los parámetros determinados fueron los mismos que en el punto 6.3.3.1.

En la gráfica 23 se representa la eficacia expresada en % de reducción de larvas recuperados por efecto de cada una de las formulaciones de SKF-ABZ, sobre el estado de larvas enquistadas ( días 34, 35 y 36 p.i.).

Al utilizar SKF-ABZ, en forma de solución líquida a la dosis de 50 mg/kg, mejora significativamente la eficacia, alcanzando un 98,78 % de reducción con un gran número de larvas recuperadas muertas (87,5 % frente al 33,6 % producido por SKF-ABZ). A esta misma dosis, el SKF-ABZ formulado como dispersión sólida ( DsSKF-ABZ), resultó ineficaz. Cabe destacar el 54,41 % de reducción alcanzado por SISKF-ABZ a la dosis de 25 mg/kg.

Nº Animal	CONTROL		SISKF-ABZ 50mg/kg		SISKF-ABZ 25mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	0	83966	0	0	1332	73260
2	0	65934	0	0	1332	2664
3	666	52947	1998	1998	666	109224
4	0	88578	1998	3330	2664	5328
5	0	75258	0	0	4662	6660
6	666	81252	0	0	1332	1998
7	1998	67932	*	*	Nd	Nd
8	0	66600	*	*	Nd	Nd
x	416,25	72808,4	666	761,14	1998	32189
D.S	706,3	11677,34	1031,7	1355,6	1459,1	47159,4
% R				98,78		54,41
% M			87,5		6,2	
t-St			- 0,53	16,15	- 2,6	2,371
p			> 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,05

Tabla 32: Efecto de SISKF-ABZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*. Tratamiento en los días 34 , 35, 36 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i. SISKF-ABZ = Solución líquida de albendazol (Smithkline Beecham Pharmaceutical) / Transcutol<sup>R</sup> (1:40). \* = los animales murieron antes de terminar el tratamiento. Nd = no determinado.

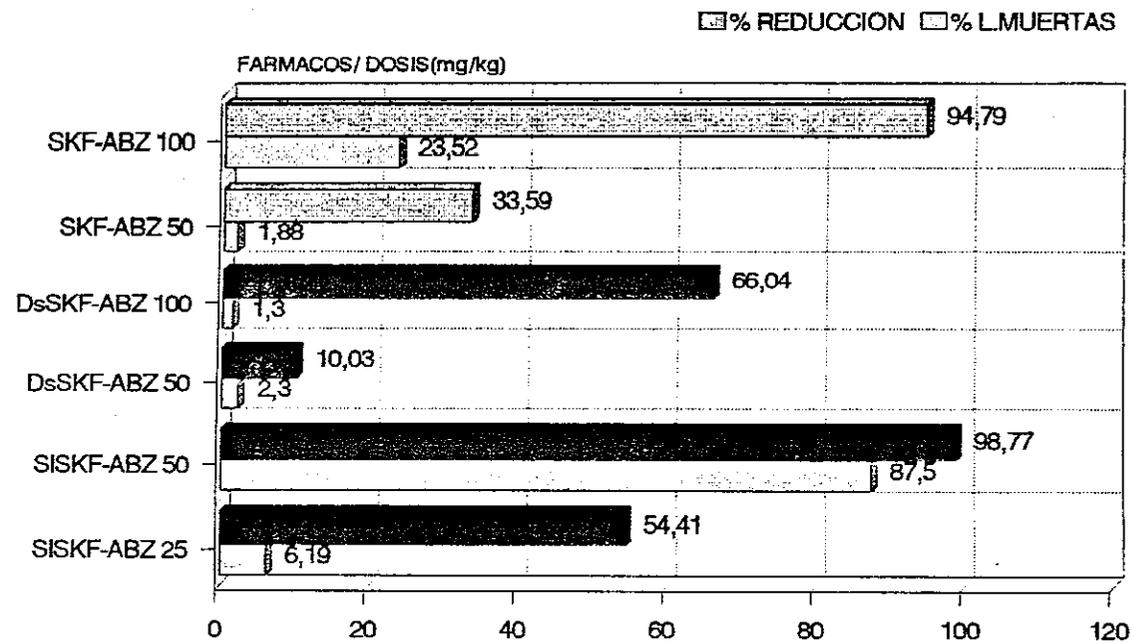
Nº Animal	CONTROL		DsSKF-ABZ 100mg/kg		DsSKF-ABZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	0	83966	0	37296	3330	49940
2	0	65934	0	2664	0	71908
3	666	52947	0	20646	1998	69264
4	0	88578	666	29970	0	51282
5	0	75258	0	21312	666	73250
6	666	81252	666	35964	4662	65268
7	1998	67932	1332	26640	0	69264
8	0	66600	0	26640	Nd	Nd
<b>X</b>	416,25	72808,4	333	25141,5	1522,3	64310,85
<b>D.S</b>		11677,3	503,44	10907,24	1872,4	9694,33
<b>%R</b>				<b>66,04</b>		<b>11,67</b>
<b>%M</b>	0,57		1,3		2,3	
<b>t-St</b>			0,27	8,437	- 1,55	1,519
<b>P</b>			> 0,05	< 0,001	> 0,05	> 0,05

**TABLA 31:** Efecto de DsSKF-ABZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*: Tratamiento en los días 34, 35, 36 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i. DsSKF-ABZ = dispersión sólida de albendazol ( Smithkline Beecham Pharmaceutical)/ kollindón<sup>R</sup> 12.

Nd = no determinado.

Figura 23. Eficacia comparada de SKF-ABZ y sus formulaciones.

Larvas enquistadas *T.spiralis*



SKF-ABZ = albendazol patrón

DsSKF-ABZ= dispersión sólida SKF-ABZ

SISKF-ABZ= solución líquida SKF-ABZ.

### 6.3.3.3 Eficacia de RBZ formulado bajo solución líquida y dispersión sólida.

Las tablas 33 y 34 recogen los resultados de la administración oral de las nuevas formulaciones de ricobendazol: DsRBZ (tabla 33) y SIRBZ (tabla 34), a ratones infestados con  $300 \pm 50$  larvas de T. spiralis, cuando estos se encuentran en fase muscular o fase de enquistamiento en músculo estriado.

Los parámetros determinados fueron los mismos que en el punto 6.3.3.1.

En la gráfica 24 se expresa la eficacia comparada, expresada como % de reducción de larvas totales recuperadas respecto al control no tratado de RBZ y sus formulaciones, también se incluyen el % de larvas muertas recuperadas en cada lote.

Al administrar ricobendazol en forma de solución líquida (SIRBZ), se produce un incremento de eficacia de un 63,87 %, respecto a DsRBZ y un 63,57 % respecto al RBZ cuando son administrados a la dosis de 50 mg/kg. Ricobendazol administrado como Dispersión sólida no mostró ninguna mejora en cuanto eficacia, respecto al ricobendazol administrado como producto puro.

N° Raton	CONTROL		DsRBZ 100mg/kg		DsRBZ 50mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	0	83966	0	19980	0	35964
2	0	65934	1998	5328	0	21312
3	666	52947	333	2664	2997	63270
4	0	88578	0	18648	0	75258
5	0	75258	4995	33966	0	55944
6	666	81252	0	17982	0	48285
7	1998	67932	0	79920	-	-
8	0	66600	-	-	-	-
X	444	72808,4	915,7	25498,3	428,1	50005,5
D.S	666	11677,34	1786,6	26126,4	1132,7	19351,57
%R				64,97		31,3
%M	0,6		3,5		0,85	
t-St			- 0,73	4,637	0,03	2,7510
P			> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,001

**TABLA 33:** Efecto de DsRBZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*: Tratamiento en los días 34, 35, 36 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i. DsRBZ = dispersión sólida ricobendazol / kollindón<sup>R</sup> 12. Nd = no determinado

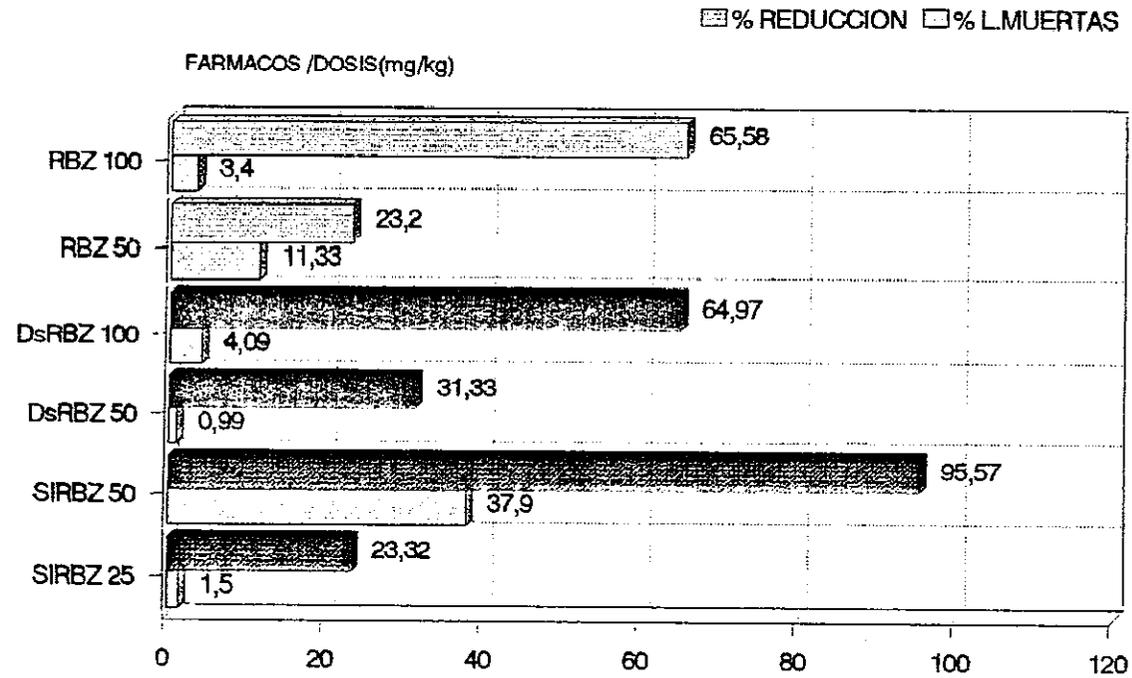
N° Raton	CONTROL		SIRBZ 50mg/kg		SIRBZ 25mg/kg	
	Muertas	Totales	Muertas	Totales	Muertas	Totales
1	0	83966	666	1998	666	15984
2	0	65934	666	666	2664	55944
3	666	52947	1998	1332	666	61272
4	0	88578	1998	1332	1998	70596
5	0	75258	1998	3996	0	64602
6	666	81252	0	9990	0	56610
7	1998	67932	*	*	0	63270
8	0	66600	Nd	Nd	Nd	Nd
X	444	72808,37	1046	3219	749,25	55468,28
D.S	666	11677,34	930,5	3509,4	1034,06	18107,8
%R				95,57		23,32
%M	0,6		32,5		1,3	
t-St			- 1,5	14,03	- 0,7	2,2398
P			> 0,05	< 0,001	> 0,05	< 0,05

**TABLA 34:** Efecto de SIRBZ sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*: Tratamiento días en los 34, 35, 36 p.i sacrificio y recuento de larvas en el día 46 p.i.  
SIRBZ = Solución líquida de ricobendazol/ Transcutol<sup>R</sup> (1:40).

\* = los ratones murieron tras el tratamiento Nd = no determinado

Figura 24. Eficacia comparada de RBZ y sus FORMULACIONES

Larvas enquistadas *T. spiralis*.



RBZ = ricobendazol

DsRBZ = dispersión sólida RBZ

SIRBZ = solución líquida RBZ.

#### 6.4. POTENCIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DEL ALBENDAZOL POR INHIBIDORES DE OXIDASAS MICROSOMALES.

##### 6.4.1 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DE LOS INHIBIDORES UTILIZADOS.

###### 6.4.1.1 Experiencias sobre la fase migratoria.

Los resultados obtenidos del tratamiento de larvas emigrantes de *T. spiralis* (días 13, 14 y 15 p.i.) con MTP y MTZ ( metirapona<sup>R</sup> y metimazol<sup>R</sup>), a las dosis únicas de 60 mg/kg y 4,5 mg/kg, se exponen en la tabla siguiente:

FARMACOS	DOSIS	x	D.S	t-Student
Control	-	44178	9320,8	-
MTP	60 mg/kg	40459,5	16334,6	0,654*
MTZ	4,5 mg/kg	50116,5	11300,9	-0,79*

\*  $p > 0,05$ .

En todos los casos se realizó el recuento de larvas totales, determinándose , media aritmética (x), desviación estándar (D.S) y t-Student, considerándose significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

### 6.4.1.2 Experiencias sobre larvas enquistadas.

Los resultados obtenidos en el tratamiento de larvas enquistadas de T.spiralis con los distintos inhibidores del metabolismo de albendazol, se exponen en la tabla siguiente:

Las dosis administradas y los parámetros determinados fueron los mismos que en el punto 6.4.1.1.

FARMACOS	DOSIS	x	D.S	t-Student
Control	-	58108,5	14485,6	-
MTP	60 mg/kg	61938	20524	-0,431*
MTZ	4,5 mg/kg	62033	13137	-0,54*

\*  $p > 0,05$ .

## 6.4.2 PRUEBAS FARMACOLÓGICAS PARA DETERMINAR LA RELACIÓN ÓPTIMA FÁRMACO/INHIBIDOR.

### 6.4.2.1 Experiencias realizadas manteniendo fija la dosis de albendazol y variando la del inhibidor.

#### 6.4.2.1.1 Experiencias sobre la fase emigrante.

En las tablas siguientes se recogen los resultados obtenidos del tratamiento de *T. spiralis*, con albendazol (100 mg/kg oral), en su administración conjunta con metimazol<sup>R</sup> (1.5, 3 y 6 mg/kg, vía intramuscular) (Tabla a) y metirapona (20, 30 y 60 mg/kg, vía subcutánea) (Tabla b). El tratamiento antihelmíntico se realizó en los días 13, 14 y 15 p.i, previa supresión de la población adulta intestinal en el día 9 p.i,

La determinación de la eficacia antihelmíntica se realizó en el día 30 p.i con el recuento de larvas totales, determinación de la media aritmética, desviación estándar, incremento de eficacia respecto al control tratado únicamente con el antihelmíntico y t-Student, considerándose significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

Se omitió el % de reducción de larvas muertas, ya que no resultó significativo en ninguna de las experiencias.

Tabla a.

Farmacos	dosis	x	D.S	% reduce	t-Student <sup>1</sup>	t-Student <sup>2</sup>
Control	-	70762	23800,2	-	-	-
ABZ	100	46619	19341,9	32,95	2,226**	-
ABZ/MTZ	100/1,5	33300	16167,94	51,62	-	1,433*
	100/3	30136,5	12615,13	56,65	-	2,018**
	100/6	38628	12696	44,44	-	0,976*

Tabla b.

Farmacos	dosis	x	D.S	% reduce	t-Student <sup>1</sup>	t-Student <sup>2</sup>
Control	-	84748,5	25382,3	-	-	-
ABZ	100	49117,5	17791,58	42,04	3,25***	-
ABZ/MTP	100/20	54778,5	13271,14	35,36	-	- 0,72*
	100/30	28971	12367,8	65,81	-	2,629**
	100/60	3441,7	10243,66	59,36	-	1,916**

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$ .

<sup>1</sup> t-Student realizada frente al control sin tratamiento.

<sup>2</sup> t-Student realizada frente al control que recibió solo albendazol

ABZ = GEN\*-ABZ (albendazol genérico) MTP = metirapona<sup>R</sup>

MTZ = metimazol<sup>R</sup>

En la administración conjunta de albendazol (100 mg/kg) con MTZ y MTP a distintas dosis, en el tratamiento de larvas emigrantes de *T. spiralis*, encontramos un porcentaje de reducción similar 51.62 , 56.65 y 44.44 % para las dosis de 1.5 , 3 y 6 mg/kg de MTZ, respectivamente y de 35,36; 65,81 y 59,63 para las dosis de 20 ,30 y 60 mg/kg de MTP.

#### 6.4.2.1.2 Experiencias sobre la fase de larvas enquistadas.

En la tabla siguiente, se recogen los resultados obtenidos del tratamiento de *T. spiralis*, con albendazol (100 mg/kg oral), en su administración conjunta con metimazol<sup>R</sup> (1,5, 3 y 6 mg/kg, vía intramuscular) y metirapona (20, 30 y 60 mg/kg, vía subcutánea). El tratamiento antihelmíntico se realizó en los días 34, 35 y 36 p.i.

La determinación de la eficacia antihelmíntica se realizó en el día 46 p.i., con el recuento de larvas totales, determinación de la media aritmética, desviación estándar, eficacia antihelmíntica respecto al testigo no tratado y t-Student, considerándose significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

Farmacos	dosis	x	D.S.	% reducec	t-Student <sup>1</sup>	t-Student <sup>2</sup>
Control	-	94574,25	22198,96	-	-	-
ABZ	100	45454,5	29907,03	51,9	3,7302**	-
ABZ/MTZ	100/1,5	31206,85	26704,9	67	-	0,9668*
	100/3	14176,28	121175,9	85,01	-	2,576**
	100/6	20375,43	20179,5	78,4	-	1,966**
ABZ/MTP	100/20	51906,37	48502	45,11	-	- 0,3*
	100/30	28542,85	23954	69,8	-	0,196*
	100/60	112078	71826	- 15,6	-	-2,40*

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$ .

<sup>1</sup> t-Student realizada frente al control sin tratamiento.

<sup>2</sup> t-Student realizada frente al control que recibió solo albendazol

ABZ = GEN\*-ABZ (albendazol genérico) MTP = metirapona<sup>R</sup>

MTZ = metimazol<sup>R</sup>.

---

En la administración conjunta de albendazol (100 mg/kg) con MTZ a distintas dosis, en el tratamiento de larvas enquistadas de T. spiralis, no encontramos diferencias estadísticamente significativas  $p > 0,05$  entre los distintos tratamientos (porcentajes de reducción de un 67 , 85.01 y 78.4 para las dosis de 1.5 , 3 y 6 mg/kg de MTZ, respectivamente).

Cuando utilizamos como inhibidor MTP, observamos que solo parece superar, en cuanto a eficacia, el albendazol administrado a la dosis de 100 mg/kg mas MTP a la dosis de 30 mg/kg, respecto a la administración del benzimidazol solo, produciéndose un incremento de actividad de un 17,9 %.

### 6.4.2.2 Experiencias realizadas manteniendo fija la dosis de inhibidor y variando la de albendazol.

#### 6.4.2.2.1 Experiencias sobre la fase emigrante.

En la tabla siguiente se recogen los resultados obtenidos del tratamiento de *T. spiralis* con albendazol (50, 75, 125 mg/kg oral), en su administración conjunta con metimazol<sup>R</sup> (3 mg/kg, vía intramuscular) y metirapona (30 mg/kg, vía subcutánea). El tratamiento antihelmíntico se realizó en los días 13, 14 y 15 p.i, previa supresión de la población adulta intestinal en el día 9 p.i,

La determinación de la eficacia antihelmíntica se realizó en el día 30 p.i con el recuento de larvas totales, determinación de la media aritmética, desviación estándar (nótese los valores obtenidos tan elevados, debido a la variabilidad metabólica intraespecífica), incremento de eficacia respecto al control tratado únicamente con el antihelmíntico y t-Student, considerándose significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

Farmacos	dosis	x	D.S	% reducc	t-Student <sup>1</sup>
Control	-	77310,66	11319,10	-	-
ABZ	50	68265	17548,8	11,7	1,0610*
	75	60168,66	17364,9	22,17	2,0257**
	125	42433,7	16139,17	45,11	4,429***
ABZ/MTZ	50/3	37105,7	15195,4	52	-
	75/3	43380,5	4941,3	43,88	-
	125/3	40337,71	6896,92	47,82	-
ABZ/MTP	50/30	33680,57	5688,45	56,43	-
	75/30	27781,71	7313,01	64,06	-
	125/30	26259,42	4907,01	66,033	-

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$ . <sup>1</sup> t-Student realizada frente al control sin tratamiento. ABZ = GEN\*-ABZ (albendazol genérico) MTP = metirapona<sup>R</sup> MTZ = metimazol<sup>R</sup>.

En la tabla siguiente se resumen los % de reducción, incrementos de eficacia antihelmíntica y significación del efecto de la asociación de albendazol/inhibidor sobre larvas emigrantes de T. spiralis.

FARMACOS	DOSIS(mg/kg)	% REDUCCIÓN	INCREMENTO DE EFICACIA	t-Student+. <i>p</i>
ABZ	50	11,7	-	-
	75	22,17	-	-
	100	37	-	-
	125	45,11	-	-
ABZ/MTZ	50/3	52	40,3	3,4345****
	75/3	43,88	21,71	2,4607**
	100/3	56,65	23,71	2,0188**
	125/3	47,82	2,71	0,3160 *
ABZ/MTP	50/30	56,43	44,73	4,9512****
	75/30	64,06	41,89	4,515****
	100/30	65,81	23,73	2,6298**
	125/30	66,04	20,92	2,5368**

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$

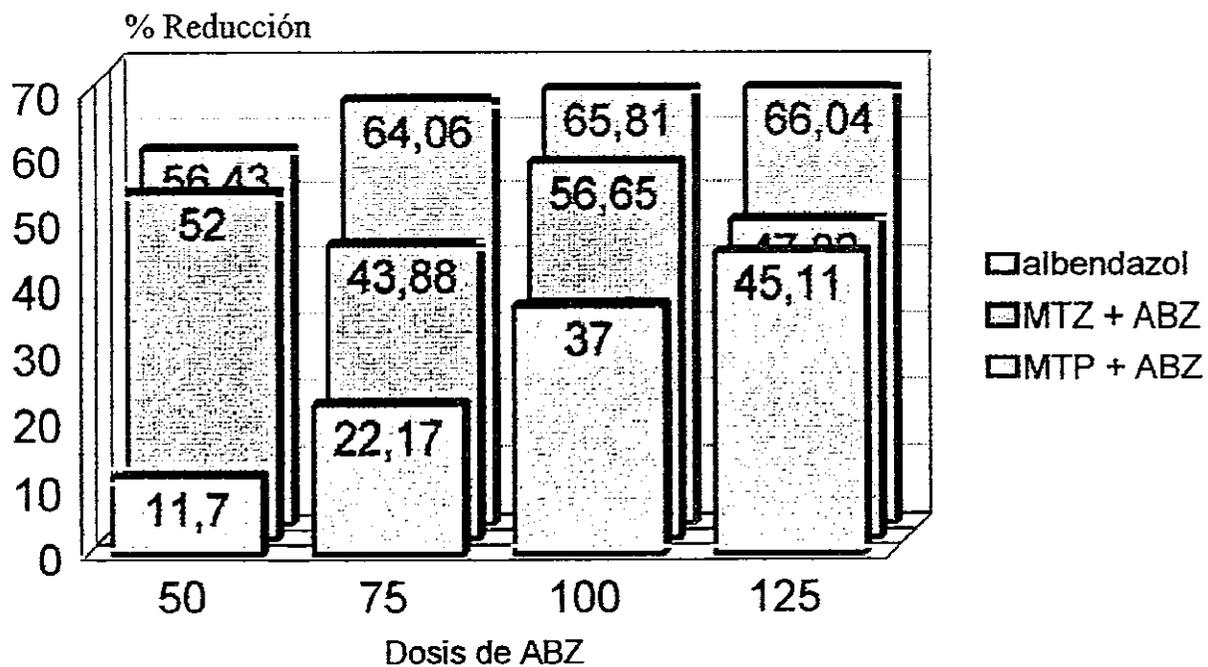
+ = resultados de t-Student realizada frente a los controles que recibieron el tratamiento con bencimidazol únicamente.

ABZ = (GEN<sup>+</sup>-ABZ) albendazol genérico (lote 2),

MTZ = metimazol<sup>R</sup> MTP = metirapona<sup>R</sup>

En la gráfica 25 se representa el incremento de eficacia producido con la asociación albendazol/inhibidor, expresada como % de reducción de larvas recuperadas, respecto a un lote testigo.

Figura 25. Actividad antiparasitaria del albendazol solo y administrado junto con inhibidores enzimáticos.



Distintas dosis de albendazol, MTZ = 3mg/kg, MTP= 30 mg/kg. Tratamiento días 13,14 y 15 p.i

En la administración conjunta de distintas dosis de albendazol con MTZ y MTP en el tratamiento de larvas emigrantes de T. spiralis encontramos un incremento de eficacia mayor (40,3 y 44,73) cuando se administran dosis bajas de bencimidazol (50 mg/kg) junto con MTZ y MTP (3 y 30 mg/kg respectivamente) frente a un 2,71 y 20,23 encontrado al aumentar la dosis de albendazol (125 mg/kg).

Por otro lado se produce un "techo" en cuanto a eficacia antiparasitaria se refiere, tendiendo a igualarse la eficacia para las distintas dosis de albendazol. Este efecto es similar al descrito por Awadzi y col., (1994) al utilizar albendazol en el tratamiento de oncocercosis en humanos, encontrando un mismo nivel de eficacia para las dosis de 800 mg/kg y 1200 mg/kg.

#### 6.4.2.2 Experiencias sobre la fase de larvas enquistadas.

En la tabla siguiente se recogen los resultados obtenidos del tratamiento de *T.spiralis*, con albendazol (50, 75, 100 y 125 mg/kg oral), en su administración conjunta con metimazol<sup>R</sup> (3 mg/kg, vía intramuscular) y metirapona (30 mg/kg, vía subcutánea).

El tratamiento antihelmíntico se realizó en los días 34, 35 y 36 p.i, La determinación de la eficacia antihelmíntica se realizó siguiendo las pautas del punto anterior.

Farmacos	dosis	x	D.S	% reduce	t-Student <sup>1</sup>
Control	-	57924,28	22832,60	-	-
ABZ	50	54659,57	21900,8	28	1,7783*
	75	45383,14	20496,6	40,2	2,6335**
	100	36059,14	21359,3	52,5	3,373***
	125	12987	15403,4	82,89	6,045***
ABZ/MTZ	50/3	37105,7	11952	51,12	-
	75/3	42788,8	8318,3	43,64	-
	125/3	25212,85	29899,44	66,79	-
ABZ/MTP	50/30	22977,57	10628,9	69,73	-
	75/30	11988,71	19146,77	84,21	-
	100/30	28542,85	23954	62,40	-
	125/30	3853,28	4370,87	94,92	-

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$ . <sup>1</sup> t-Student realizada frente al control sin tratamiento.  
 ABZ = GEN\*-ABZ (albendazol genérico) MTP = metirapona<sup>R</sup> MTZ = metimazol<sup>R</sup>.

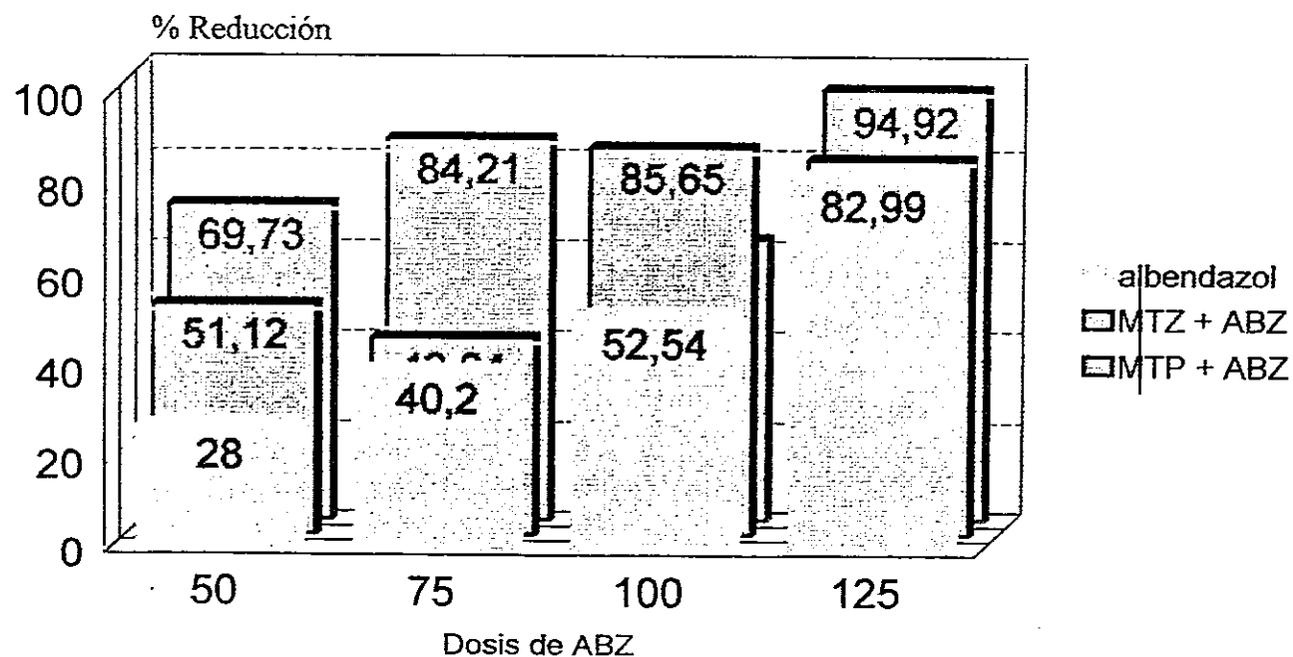
En la tabla siguiente se resumen los % de reducción, incrementos de eficacia antihelmíntica y significación del efecto de la asociación de albendazol/inhibidor, sobre larvas enquistadas de T. spiralis.

FARMACOS	DOSIS(mg/kg)	% REDUCCION	INCREMENTO DE EFICACIA	t-Student. + <i>p</i>
ABZ	50	28	-	-
	75	40,2	-	-
	100	52,5	-	-
	125	82,89	-	-
ABZ/MTZ	50/3	51,12	23,12	1,8615**
	75/3	43,64	3,44	0,2889 *
	100/3	85,65	33,11	3,7302**
	125/3	66,79	-16,2	- 0,967 *
ABZ/MTP	50/30	69,73	41,73	3,2191**
	75/30	84,21	44,01	3,1501**
	100/30	62,40	9,86	0,6196 *
	125/30	94,92	12,03	1,509 *

\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ . + t-Student realizada frente al control con tratamiento.  
 ABZ = GEN\*-ABZ (albendazol genérico) MTP = metirapona R MTZ = metimazol<sup>R</sup>.

En la gráfica 26 se representa el incremento de eficacia producido con la asociación albendazol/inhibidor, expresada como % de reducción de larvas recuperadas respecto a un lote testigo.

Figura 26. Actividad antiparasitaria frente a *L. enquistadas*, del albendazol solo y coadministrado con inhibidores enzimáticos.



distintas dosis de albendazol, MTZ = 3mg/kg, MTP= 30 mg/kg. Tratamiento días 34 ,35 y 36 p.i

### 6.4.3 ESTUDIO DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS Y BIO-FARMACEUTICOS.

La tabla siguiente muestran los resultados del estudio biofarmacocinético del albendazol administrado oralmente a las dosis de 100 mg/kg y 50 mg/kg, utilizados como control de las posibles modificaciones que los inhibidores enzimáticos puedan producir en su metabolismo.

ALBENDAZOL (50 mg/kg)		TIEMPOS ( h )	ALBENDAZOL (100 mg/kg)	
C (µg/ml)	D.S.		C (µg/ml)	D.S.
9,25	4,74	0.25	12,53	2,93
11,00	3,42	3	12,96	2,30
7,04	1,13	6	5,97	3,92
2,58	0,01	12	4,69	1,19
4,44	2,47	24	7,71	0,59
3,5	1,65	36	7,41	1,46
7,95	2,93	48	6,34	2,39

Concentraciones plasmáticas del albendazol sulfóxido (µg/ml) para cada tiempo dado ( valor medio de tres determinaciones (C)) y desviación estándar (D.S.), tras la administración de albendazol(oral) a ratones.

**4.3.1 Estudio de la modificación de las concentraciones plasmáticas de ABZSO y ABZSO<sub>2</sub> tras la administración de inhibidores microsomaes. Dosis única (t=0).**

**6.4.3.1.1 Efecto del MTP sobre el metabolismo del albendazol.**

La tabla siguiente muestran los resultados del estudio farmacocinético de la administración de ABZ junto con MTP 30 mg/kg a ratones.

ABZ (50mg/kg) + MTP		TIEMPOS (h)	ABZ (100mg/kg) + MTP	
C (µg/ml)	D.S.		C (µg/ml)	D.S.
7,98	2,75	0.25	7,79	0,86
24,86	3,61	3	10,85	2,17
3,4	0,05	6	17,31	3,91
2,36	0,42	12	15,65	3,79
1,74	2,07	24	22,40	2,27
2,21	2,54	36	19,81	1,68
3,5	1,01	48	20,55	3,15

Concentraciones plasmáticas del albendazol sulfóxido (µg/ml) para cada tiempo dado (valor medio de tres determinaciones (C)) y desviación estándar (D.S.), tras administración de albendazol(oral)/ metirapona<sup>R</sup> (subcutánea).

En la tabla siguiente se recogen los resultados medios y desviación estándar de los siguientes parámetros farmacocinéticos ( $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-48h}$ ), determinados para la asociación albendazol/metirapona<sup>R</sup>, así como para el albendazol control administrados en dosis únicas.

FARMACOS	DOSIS	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$ABC(\mu\text{gh/ml})$
ABZ	100	3	12,96	340,159
	50	3	11,00	268,033
ABZ/MTP	50/30	3	24,86	188,38
	100/30	24	22,40	985,34

La constante de eliminación para cada tratamiento, no se pudo determinar debido a que las concentraciones plasmáticas a  $t > 48$  horas se mantuvieron estables, posiblemente por un efecto del ciclo enterohepático, unión a proteínas plasmáticas o a un fenómeno de redistribución en tejidos, hecho por el cual, no se determinaron las semividas de eliminación.

El perfil farmacocinético, después de la administración oral a ratones de ABZ (100 y 50 mg/kg) y la administración conjunta de ABZ 50 mg/kg y MTP 30 mg/kg, fueron similares, no encontrándose diferencias significativas  $p > 0,05$  en cuanto a  $T_{max}$  (aprox. 3h) aunque sí en cuanto a  $C_{max}$   $p < 0,05$  y  $ABC_{0-6h}$  mayor tras la administración del albendazol más el inhibidor. Por otro lado, la velocidad de desaparición de ABZSO del plasma fue algo mayor para el segundo, hecho que se refleja en una menor  $ABC_{0-48h}$ .

Comparando el perfil farmacocinético tras la coadministración de ABZ/MTP variando la dosis de albendazol, encontramos diferencias significativas en cuanto a  $T_{max}$   $p < 0,05$  y  $ABC_{t=0-48h}$   $p < 0,05$ , mayores tras la coadministración de ABZ 100 mg/kg/MTP 30mg/kg. No se encontraron diferencias significativas respecto a  $C_{max}$  para ambos tratamientos.

#### 6.4.3.1.2 Efecto del MTZ sobre el metabolismo del albendazol.

La tabla siguiente muestran los resultados del estudio farmacocinético de la modificación, en las concentraciones plasmáticas, producidas por la administración conjunta de ABZ/MTZ 3 mg/kg.

ABZ (50mg/kg) + MTZ		TIEMPOS (h)	ABZ (100mg/kg) + MTZ	
C ( $\mu\text{g/ml}$ )	D.S.		C ( $\mu\text{g/ml}$ )	D.S.
10,98	0,68	0.25	Nd	Nd
14,47	3,06	3	27,23	4,19
13,65	4,48	6	23,13	7,70
14,92	1,81	12	4,41	1,2
30,88	1,90	24	5,25	1,50
26,22	0,86	36	2,10	0,38
30,32	1,77	48	3,67	1,23

Concentraciones plasmáticas del albendazol sulfóxido ( $\mu\text{g/ml}$ ) para cada tiempo dado( valor medio de tres determinaciones (C)) y desviación estándar (D.S.) tras la administración de albendazol(oral)/ metimazo]<sup>R</sup> (intramuscular). Nd = no determinado.

En la tabla siguiente se recogen los resultados medios y desviación estándar de los siguientes parámetros farmacocinéticos ( $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-48h}$ ), determinados para la asociación albendazol/metimazol<sup>R</sup>, así como para el albendazol control administrados en dosis únicas.

FARMACOS	DOSIS	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$ABC(\mu\text{gh/ml})$
ABZ/MTZ	50/3	24/48	30,88/30,32	1120,89
	100/3	3	27,23	362,15

La constante de eliminación y semivida de eliminación no pudieron ser determinadas ya que las concentraciones plasmáticas a  $t > 48$  horas se mantuvieron estables, posiblemente por un efecto del ciclo enterohepático, unión a proteínas plasmáticas o a un fenómeno de redistribución en tejidos.

El perfil farmacocinético después de la administración oral a ratones de ABZ (100 y 50 mg/kg) y coadministración de ABZ 100 mg/kg/MTZ 3 mg/kg fue similar, no encontrándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), en cuanto a  $T_{max}$  (aprox. 3h) aunque sí en cuanto a  $C_{max}$  ( $p < 0,05$ ), mayor tras la coadministración del albendazol y el inhibidor.

Se produce un incremento en las concentraciones plasmáticas en las 12 primeras horas, tras el tratamiento con ABZ 100 mg/kg /MTZ 3 mg/kg, que disminuyen rápidamente incluso, por debajo del control, en las horas siguientes, por lo que ambos tratamientos muestran un  $ABC_{0-48h}$  estadísticamente similar

Comparando el perfil farmacocinético tras la coadministración de ABZ/MTZ, variando la dosis de albendazol, encontramos diferencias significativas en cuanto a  $T_{max}$   $p < 0,05$  y  $ABC_{t=0-48h}$   $p < 0,05$ , mayores tras la coadministración de ABZ 50 mg/kg/MTZ 3 mg/kg. No se encontraron diferencias significativas respecto a  $C_{max}$ , para ambos tratamientos.

En las figuras 27 y 28 (concentraciones plasmáticas/tiempo) se encuentran representados las modificaciones en el perfil farmacocinético del albendazol por el efecto del MTZ y MTP, en su metabolismo.

Figura 27. Modificación de las concentraciones plasmáticas del albendazol, mediante el uso de inhibidores de su metabolismo

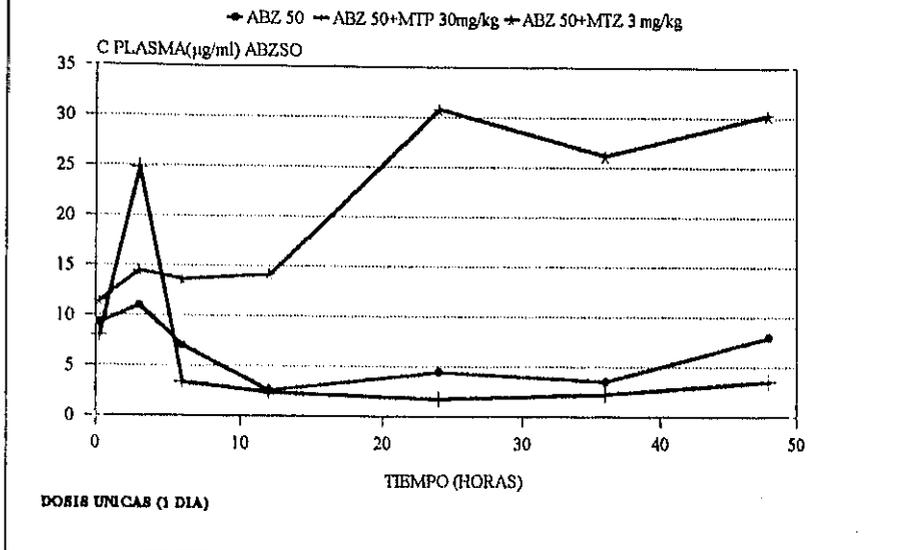
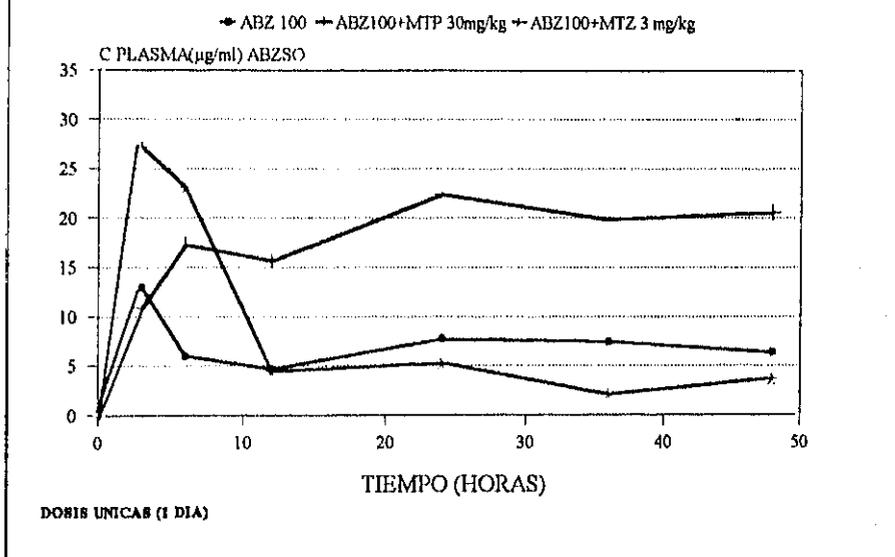


Figura 28. Modificación de las concentraciones plasmáticas del albendazol, mediante el uso de inhibidores metabólicos.



**6.4.3.2 Estudio de la modificación de las concentraciones plasmáticas de ABZSO, tras la administración de inhibidores microsomales, en dosis repetidas (t=0, 24 y 48 horas).**

Las tablas siguientes muestran los resultados del estudio farmacocinético de la modificación en las concentraciones plasmáticas, producida por la administración conjunta de ABZ/MTP 30 mg/kg (Tabla 35) y ABZ/MTZ 3 mg/kg (tabla 36) en dosis repetidas, durante tres días consecutivos.

ABZ 50 mg/kg / MTP		TIEMPO (h)	ABZ 100 mg/kg / MTP	
C ( $\mu\text{g/ml}$ )	D.S		C ( $\mu\text{g/ml}$ )	D.S.
23,31	3,46	3	10,85	2,17
4,4	0,05	6	17,31	3,91
5,59	0,95	12	15,65	3,79
3,25	0,06	24	22,40	2,27
20,84	1,44	27	8,22	3,15
4,47	0,8	36	21,73	5,22
3,61	0,00	48	15,12	0,00
18,55	3,31	51	3,53	0,37
8,61	3,74	60	21,8	1,07

Tabla 35. Concentraciones plasmáticas del albendazol sulfóxido ( $\mu\text{g/ml}$ ) para un tiempo dado (valor medio de tres determinaciones (C)) y desviación estándar (D.S.), tras la administración de albendazol(oral)/ metirapona<sup>R</sup> (subcutánea). Nd = no determinado

ABZ 50 mg/kg / MTZ 3 mg/kg		
T (h)	C ( $\mu\text{g/ml}$ )	D.S.
3	14,47	3,06
6	13,65	4,48
12	14,92	1,81
24	30,88	1,90
27	25,84	9,59
36	4,5	1,99
48	7,79	4,60
51	26,19	4,95
60	14,63	4,96

Tabla 36: Concentraciones plasmáticas del albendazol sulfóxido ( $\mu\text{g/ml}$ ) para un tiempo dado (valor medio (C)) y desviación estándar (D.S.), tras la administración de albendazol (oral) / metimazol<sup>R</sup> (intramuscular).

En la tabla siguiente se recogen los resultados medios y desviación estándar de los siguientes parámetros farmacocinéticos ( $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-48h}$  y  $ABC_{0-60h}$ ), determinados para la asociación albendazol/metirapona<sup>R</sup> y albendazol/metimazol<sup>R</sup>, administrados en dosis repetidas, durante tres días consecutivos.

FARMACOS	DOSIS	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
				0-48h	0-60h
ABZ/MTZ	50/3	24/ 51	30,88/ 26,19	719,80	954,42
ABZ/MTP	50/30	3/ 27/ 51	23,31 /20,84 /18,55	358,1	513,5
	100/30	24/ 36/ 51	22,40/ 21,73 /21,8	787,5	929,45

Tras administrar a ratones tres dosis repetidas de ABZ 50 mg/kg junto con MTP 30 mg/kg, encontramos que las concentraciones plasmáticas de ABZSO, siguen un comportamiento cíclico que se repite cada 24 horas, produciéndose 3 valores de  $C_{max}$ , a los tiempos 3, 27, 51 horas, es decir, 3 horas después de que los animales hubieran recibido el tratamiento antihelmíntico, este aumento de las concentraciones plasmáticas, iba acompañado de una disminución brusca de las mismas, en las 12 horas siguientes a la administración del medicamento, manteniéndose más o menos estables durante las 12 horas siguientes.

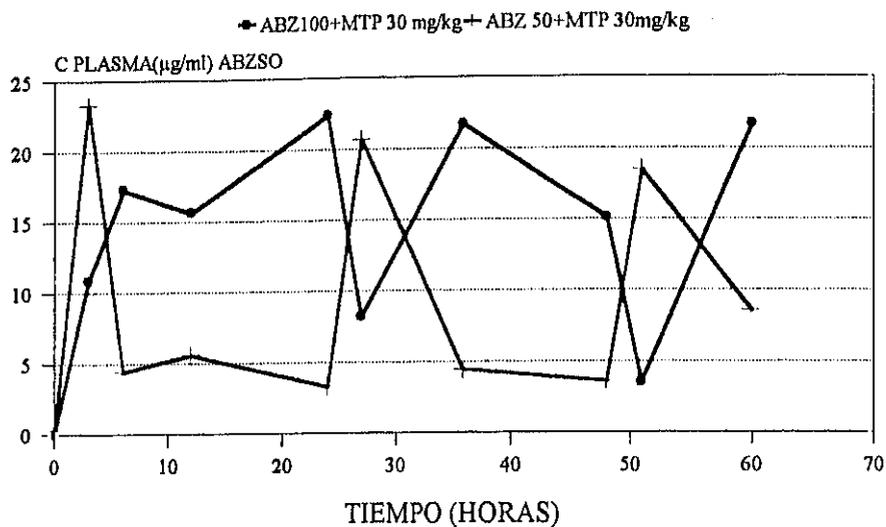
Tras el tratamiento de los animales con ABZ 100 mg/kg mas MTP 30 mg/kg, también observamos un comportamiento repetitivo, pero inverso al anterior, ya que al administrar una primera dosis se produce un aumento progresivo de las concentraciones plasmáticas de ABZSO, alcanzándose la primera  $C_{max}$  a las 24 p.a(post-administración); inmediatamente después del 2º tratamiento se produce una disminución en las concentraciones plasmáticas, produciéndose un mínimo (a las 3h p.a.) acompañado de un rápido aumento de la concentración, hasta alcanzar una segunda  $C_{max}$  a las 36 h p.a. A las 48 h, tras la administración de una tercera dosis, se vuelve a producir una  $C_{mínima}$ , 3 horas p.a. de la tercera dosis y una nueva  $C_{max}$  12 horas después.

Tras el tratamiento de los animales con ABZ 50 mg/kg junto con MTZ 3 mg/kg, durante tres días, observamos una modificación en la cinética plasmática del ABZSO respecto a la terapia única, ya que alcanza una Cmax a las 24 h p.a. e inmediatamente después de la administración de una segunda dosis se produce una disminución en las concentraciones plasmáticas, produciéndose un mínimo (a las 36h p.a.) acompañado de un aumento progresivo de la concentración, hasta las 48 h, donde tras la administración de una nueva dosis se alcanzó una nueva Cmax (a las 51 p.a.), momento a partir del cual se produce una nueva disminución en la concentración plasmática de ABZSO.

Los perfiles farmacocinéticos de ABZSO, tras la administración de ABZ (50 y 100 mg/kg) junto con MTP 30 mg/kg, en un período de tres días, se muestran en la figura 29.

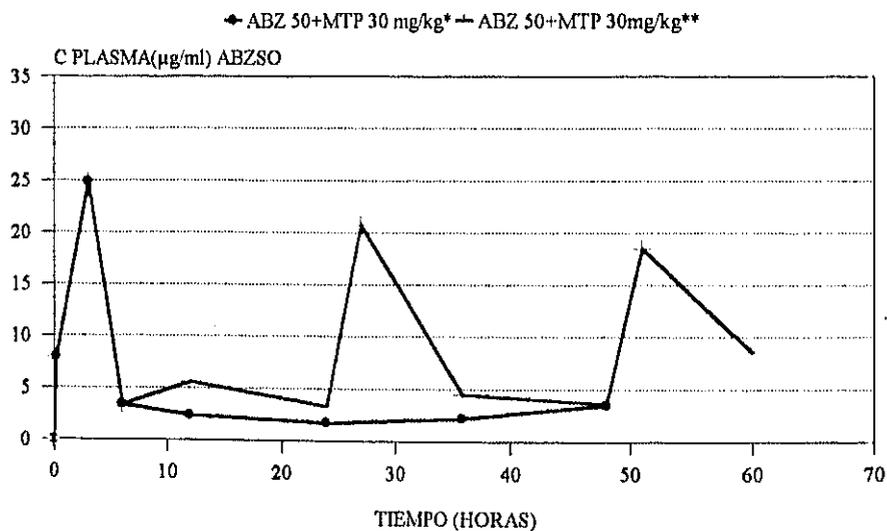
Las figuras 30, 31 y 31A muestran los perfiles farmacocinéticos comparados (dosis única / dosis repetidas), tras la administración de MTP 30 mg/kg mas albendazol (50 mg/kg y 100 mg/kg) y de la administración de Albendazol 50 mg/kg junto con MTZ 3 mg/kg.

Figura 29. Modificación del perfil farmacocinético del albendazol mediante el uso de MTP.



DOSIS REPETIDA (3 DIAS CONSECUTIVOS, CADA 24 HORAS)

Figura 31. Efecto del MTP en el metabolismo del albendazol. Prueba comparativa dosis única/dosis repetidas.



\* DOSIS ÚNICAS (1 DIA)  
 \*\* DOSIS REPETIDAS (3 DIAS CONSECUTIVOS, CADA 24 HORAS)

Figura 30. Efecto del MTP en el metabolismo del albendazol, Pruebas comparativas dosis únicas/dosis repetidas

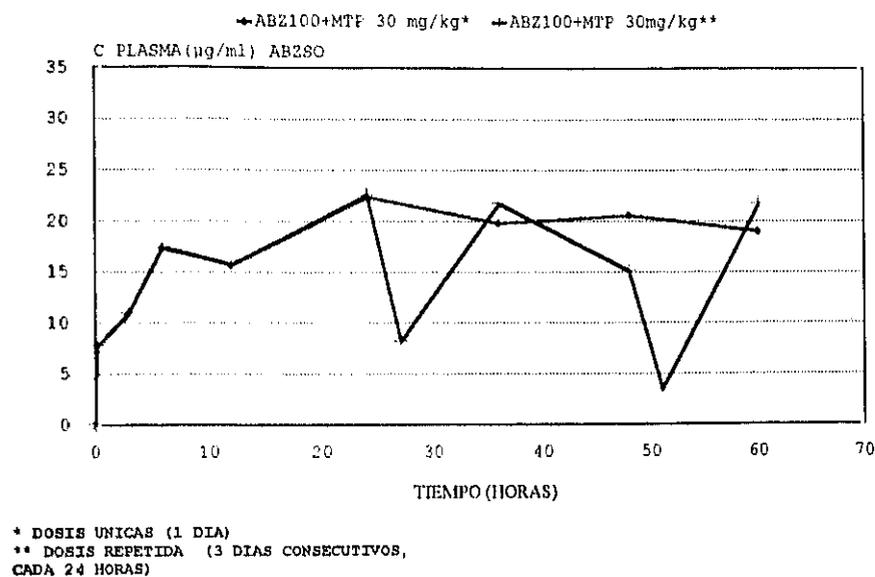
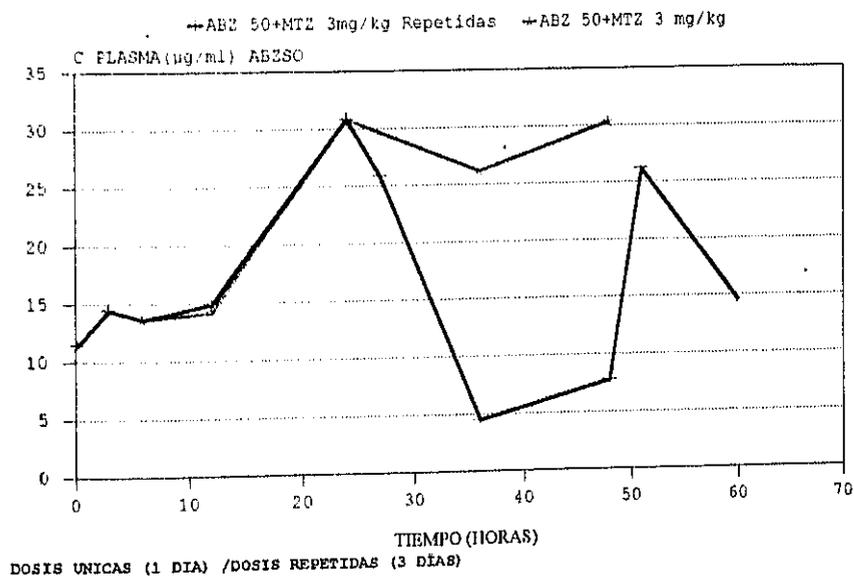


Figura 31A. Modificación de las concentraciones plasmáticas del albendazol, mediante el uso del MTZ



Para comparar los resultados obtenidos, se realizó un análisis de la varianza de los parámetros farmacocinéticos observados.

	A	B	C	D	E	F
B	$C_{max}$ $T_{max}^{**}$ ABC				* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ $p > 0,05$	
C	$C_{max}$ $T_{max}^{**}$ ABC*	$C_{max}$ $T_{max}$ ABC				
D	$C_{max}^{**}$ $T_{max}$ ABC	$C_{max}^*$ $T_{max}^{**}$ ABC	$C_{max}$ $T_{max}^{**}$ ABC*			
E	ABC	ABC	ABC*	ABC		
F	ABC*	ABC	ABC*	ABC*	$C_{max}$ $T_{max}^{**}$ ABC	
G	ABC	ABC	ABC**	ABC	$C_{max}^*$ $T_{max}^{**}$ ABC	$C_{max}^{**}$ $T_{max}^{**}$ ABC

**TABLA 37:** Resultado del ANOVA comparando las distintas formulaciones estudiadas.

A = ABZ 100 /MTP 30 B = ABZ 100 /MTZ 3 C = ABZ 50 /MTP 30.

D = ABZ 50 / MTZ 3 A, B, C, D fueron administrados en una única dosis.

E = ABZ 100 / MTP 30 F = ABZ 50 / MTP 30 G = ABZ 50 /MTZ 3.

E, F, G fueron administrados durante tres días consecutivos.

Se encontraron diferencias en cuanto a  $ABC_{0-60h}$ , siendo mucho menor para ABZ 50 mg/kg / MTP 30 mg/kg , aumentando considerablemente para ABZ 100 / MTP 30 y manteniendo un valor intermedio para el tratamiento con ABZ 50 / MTZ 3. Las  $C_{max}$  fueron aproximadamente las mismas  $p > 0,05$ , con  $T_{max}$  más tempranas en el tratamiento con ABZ 50 / MTP 30.

#### 6.4.4 ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DEL ALBENDAZOL, TRAS LA COADMINISTRACION DE DOSIS UNICAS FARMACO/INHIBIDOR.

Para realizar el estudio comparativo respecto a la potenciación de la actividad antihelmíntica del albendazol, administrado junto con inhibidores de sus metabolismo, siguiendo distintas pautas posológicas, se eligieron las siguientes dosis:

- albendazol 100 mg/kg mas metirapona <sup>R</sup> 30 mg/kg.
- albendazol 50 mg/kg mas metimazol <sup>R</sup> 3 mg/kg.

##### 6.4.4.1 EFECTO DE LA ASOCIACION GEN<sup>\*</sup>-ABZ / MTZ y GEN<sup>\*</sup>-ABZ /MTP.

###### 6.4.4.1.1 Experiencias sobre larvas emigrantes.

En la tabla siguiente se recogen los resultados obtenidos de tratamiento de T. spiralis con albendazol (50 mg/kg oral), en su administración conjunta con metimazol <sup>R</sup> (3 mg/kg intramuscular) y albendazol (100 mg/kg oral) junto con (MTP 30 mg/kg subcutánea)(Tabla 38).

El tratamiento se realizó en el día 14 p.i, previa supresión de la población adulta intestinal en el día 9 p.i,

La determinación de la eficacia antihelmíntica se realizó en el día 30 p.i con el recuento de larvas totales, determinación de la media aritmética, desviación estándar, eficacia antihelmíntica respecto al control no tratado únicamente, y t-Student, considerándose significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

Farmacos	dosis	x	D.S	% reducc	t-Student <sup>1</sup>
Control	-	65268	23544,7	-	-
ABZ	50	77922	14965	-	-1,110*
ABZ/MTZ	50/3	45788,5	15272,2	30	3,68***
Control	-	82013,14	13580,6	-	-
ABZ	100	74592	18695,5	9,048	0,84*
ABZ/MTP	100/30	35631	13635	56,55	4,65***

Tabla 38. \*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$ . <sup>1</sup> t-Student realizada frente al control sin tratamiento. ABZ = GEN\*-ABZ (albendazol genérico) MTP = metirapona<sup>R</sup> MTZ = metimazol<sup>R</sup>.

En la tabla siguiente se resumen los % de reducción y los incrementos de eficacia antihelmíntica de la asociación de albendazol/inhibidor sobre larvas emigrantes de *T. spiralis*, administrados en pautas posológicas distintas

FARMACOS	DOSIS(mg/kg)	% REDUCCION	INCREMENTO DE EFICACIA
ABZ	50(1D)	-	-
	50(3D)	11,7	-
ABZ/MTZ	50/3(1D)	30	41,23
	50/3(3D)	52	40,3
ABZ	100(1D)	9,048	-
	100(3D)	42,04	-
ABZ/MTP	100/30(1D)	56,55	47,50
	100/30(3D)	65,81	23,77

Para establecer la significación de los resultados obtenidos se realizó un análisis de la varianza representado en las tablas siguientes:

	1	2	3
2	3,681 <sup>***</sup>		
3	2,153 <sup>***</sup>	-1,56 <sup>*</sup>	
4	5,897 <sup>***</sup>	1,79 <sup>*</sup>	3,43 <sup>***</sup>

<sup>\*</sup>  $p > 0,05$    <sup>\*\*</sup>  $p < 0,05$    <sup>\*\*\*</sup>  $p < 0,01$

GEN\*-ABZ 50 mg/kg (1 = 1 dosis, 3 = 3 dosis, cada 24 horas),

GEN\*-ABZ 50 mg/kg / MTZ 3 mg/kg (2 = 1 dosis, 4 = 3 dosis, cada 24 horas).

	1	2	3	
2	(4,655) <sup>***</sup>			* $p > 0,05$ ** $p < 0,05$ *** $p < 0,01$
3	(-2,703) <sup>***</sup>	(-1,7018) <sup>*</sup>		
4	(4,861) <sup>***</sup>	(1,0233) <sup>*</sup>	(2,6298) <sup>***</sup>	

GEN\*-ABZ 100 mg/kg (1 = 1 dosis, 3 = 3 dosis, cada 24 horas),

GEN\*-ABZ 100 mg/kg / MTP 30 mg/kg (2 = 1 dosis, 4 = 3 dosis, cada 24 horas).

( ) = valor de la t-Student.

Se alcanza un incremento de eficacia de un 41,23 %, en la terapia conjunta albendazol/MTZ en dosis únicas, respecto a la administración de albendazol solo ( $p < 0,001$ ) y este incremento resulta ser similar al alcanzado al administrar albendazol durante 3 días consecutivos.

La administración de una dosis única de ABZ/MTZ, produce un incremento de eficacia de un 18,3 % superior a la administración de ABZ 50 mg/kg, en tres dosis consecutivas, cada 24 horas ( $p > 0,05$ ).

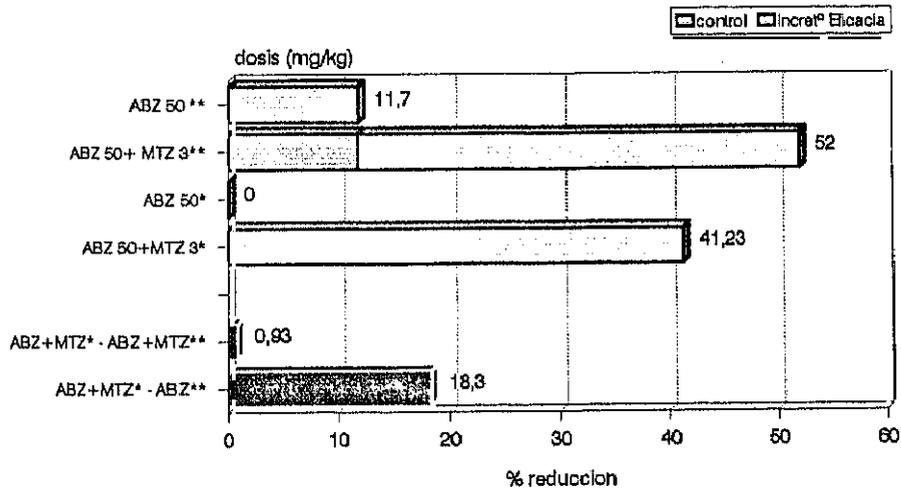
---

La administración de albendazol/metirapona en dosis únicas(un día de tratamiento) supone una actividad antihelmíntica (56,55 %), similar a la administración de la misma dosis durante 3 días (65,81 %)  $p > 0,05$ .

Dosis únicas de albendazol/metirapona incrementa la eficacia del albendazol en un 47,50 %, un 23,8 % mas que la misma pauta de dosificación, aplicada durante 3 días consecutivos.

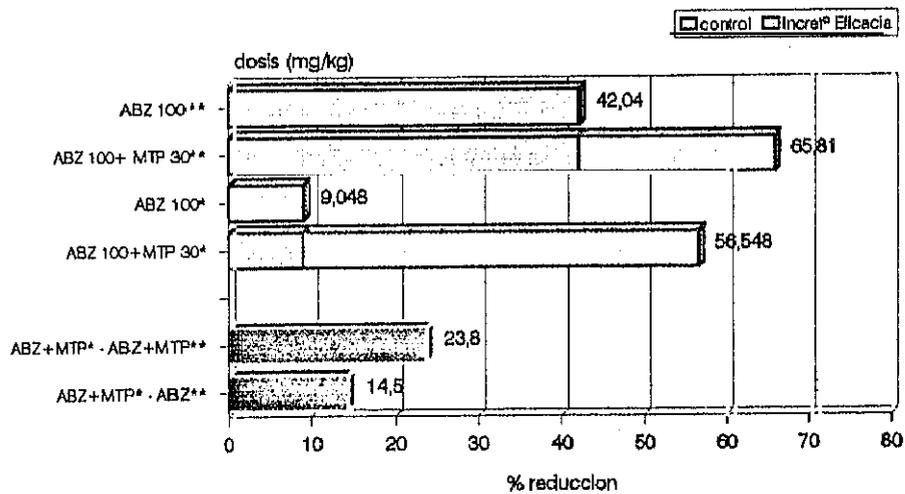
En la gráfica 32 y 33 se representa el incremento de eficacia producido con la asociación albendazol/inhibidor, administrado en dosis únicas y tres dosis consecutivas, expresada como % de reducción de larvas recuperadas respecto a un lote testigo.

Figura 32. Actividad comparada del uso de inhibidores metabólicos del albendazol, administrado en dosis únicas ó 3 dosis repetidas cada 24 horas. *L. emigrans* de *T. spiralis*



\* dosis única (un solo día)  
 \*\* dosis repetidas (cada 24 h, 3 días)

Figura 33. Actividad comparada del uso de inhibidores metabólicos del albendazol, administrado en dosis únicas ó 3 dosis repetidas cada 24 horas. *L. emigrans* de *T. spiralis*



\* dosis única (un solo día)  
 \*\* dosis repetidas (cada 24 h, 3 días)

#### 6.4.4.1.2 Experiencias sobre larvas enquistadas.

En la tabla siguiente se recogen los resultados obtenidos de tratamiento de *T. spiralis* con albendazol (50 mg/kg oral), en su administración conjunta con metimazol<sup>R</sup> (3 mg/kg, intramuscular) y albendazol (100 mg/kg, oral) junto con metirapona<sup>R</sup> (30 mg/kg, subcutánea).

El tratamiento se realizó en el día 35 p.i; la determinación de la eficacia antihelmíntica se realizó en el día 46 p.i con el recuento de larvas totales, determinación de la media aritmética, desviación estándar, incremento de eficacia respecto al control tratado únicamente con el antihelmíntico y t-Student, considerándose significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

Farmacos	dosis	x	D.S	% reducec	t-Student <sup>1</sup>	t-Student <sup>1</sup>
Control	-	35742	11586,6	-	-	-
ABZ	50	38184	8174,9	-	-0,421*	-
ABZ/MTZ	50/3	25530	8981,5	28,57	1,706*	2,552**
ABZ	100	36519	5234,21	-	-0,149*	-
ABZ/MTP	100/30	22089	15986,3	38,198	1,693*	2,103**

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$ .

<sup>1</sup> t-Student realizada frente al control sin tratamiento.

<sup>2</sup> t-Student realizada frente al control tratado con albendazol.

ABZ = GEN\*-ABZ (albendazol genérico) MTP = metirapona<sup>R</sup>

MTZ = metimazol<sup>R</sup>.

En la tabla siguiente se resumen los % de reducción, incrementos de eficacia antihelmíntica y significación del efecto de la asociación de albendazol/inhibidor, sobre larvas enquistadas de *T. spiralis*, según dos pautas posológicas distintas.

Tabla 40

FARMACOS	DOSIS(mg/kg)	% REDUCCION	INCREMENTO DE EFICACIA
ABZ	50(1D)	-	-
	50(3D)	28	-
ABZ/MTZ	50/3(1D)	28,57	35,37
	50/3(3D)	51,12	23,12
ABZ	100(1D)	-	-2,1
	100(3D)	52,54	-
ABZ/MTP	100/30(1D)	38,19	40,3
	100/30(3D)	62,4	9,88

ABZ = (GEN<sup>\*</sup>-ABZ) albendazol genérico (lote 2)

MTZ = metimazol<sup>R</sup> MTP = metirapona<sup>R</sup>

1D = un día de tratamiento. 3D = tres días de tratamiento consecutivos.

En las gráficas 34 y 35 se representa el incremento de eficacia producido con la asociación albendazol/inhibidor, administrado en dosis únicas y tres dosis consecutivas, expresada como % de reducción de larvas recuperadas respecto a un lote testigo.

Figura 34. Actividad comparada del uso de inhibidores metabólicos del albendazol, administrado en dosis únicas ó 3 dosis repetidas cada 24 horas. L. enquistadas de *T. spiralis*

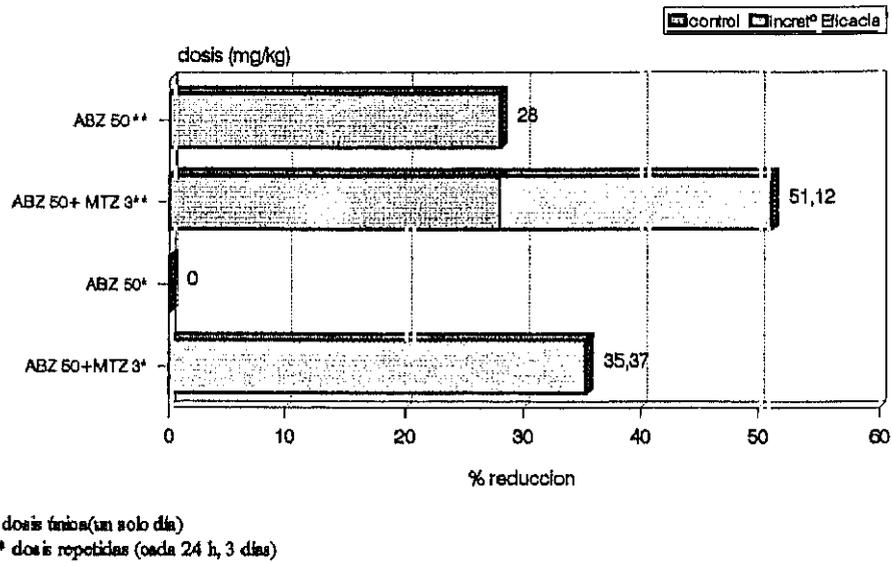
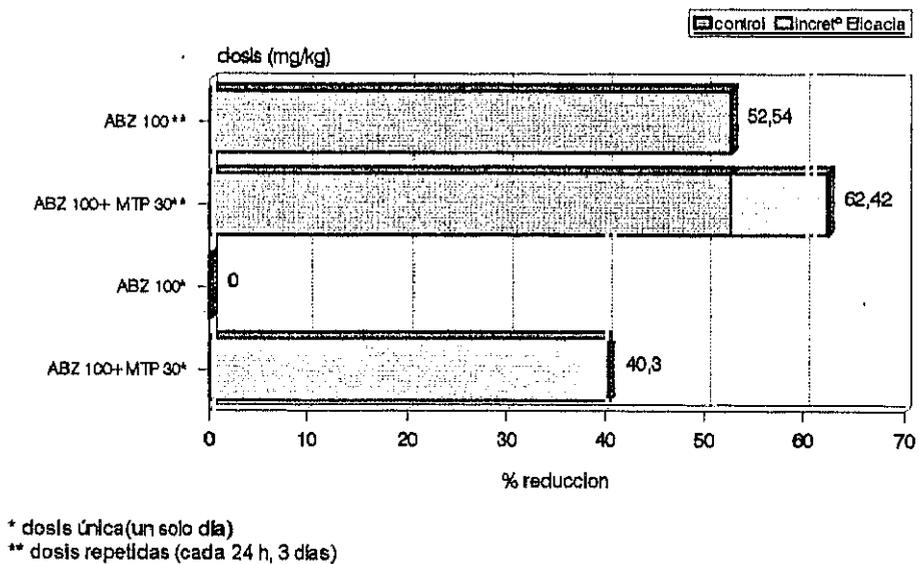


Figura 35. Actividad comparada del uso de inhibidores metabólicos del albendazol, administrado en dosis únicas ó 3 dosis repetidas cada 24 horas. L. enquistadas de *T. spiralis*



Para establecer la significación de los resultados obtenidos se realizó un análisis de la varianza representado en las tablas siguientes:

	1	2	3
2	(0,917)*		
3	(2,07)**	(0,7)*	
4	(2,03)**	(0,8)*	(0,2)*

GEN\*-ABZ 100 mg/kg (1 = 1 dosis, 3 = 3 dosis, cada 24 horas),

GEN\*-ABZ 100 mg/kg / MTP 30 mg/kg (2 = 1 dosis, 4 = 3 dosis, cada 24 horas). ( )  
= valor de la t-Student.

La administración de una dosis única de albendazol (100 mg/kg) mas metirapona<sup>R</sup> 30 mg/kg, produce un incremento de eficacia antihelmíntica de 40,298 %, respecto a la administración de albendazol ( $p < 0,05$ ). Sin embargo no se aprecia una mejora significativa respecto a la administración de tres dosis consecutivas.

	1	2	3
2	(2,45)**		
3	(2,41)*	(0,284)*	
4	(5,48)***	(2,04)**	(1,86)*

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$

GEN\*-ABZ 50 mg/kg (1 = 1 dosis, 3 = 3 dosis, cada 24 horas),

GEN\*-ABZ 50 mg/kg / MTZ 3 mg/kg (2 = 1 dosis, 4 = 3 dosis, cada 24 horas).

La administración de una dosis única de albendazol (50 mg/kg) mas metimazol<sup>R</sup> 3 mg/kg, iguala su eficacia antihelmíntica con la administración de tres dosis consecutivas de albendazol. Sin embargo no mejora la eficacia obtenida con la asociación fármaco / inhibidor, en la terapia continuada durante 3 días.

## 6.5. POTENCIACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DEL ALBENDAZOL MEDIANTE EL USO CONJUNTO DE DOS RECURSOS FARMACOTECNICOS.

### 6.5.1 Efecto de la asociación SIGEN-ABZ/MTP y SIGEN-ABZ/MTZ sobre larvas emigrantes de T.spiralis.

En la tabla siguiente se recogen los resultados obtenidos de tratamiento de T.spiralis con solución líquida de albendazol genérico (25 mg/kg oral), en su administración conjunta con metimazol<sup>R</sup> (1,5 mg/kg, vía intramuscular) y metirapona<sup>R</sup> 20 mg/kg, (subcutánea).

El tratamiento se realizó en los días 13, 14 y 15 p.i, previa supresión de la población adulta intestinal en el día 9 p.i. La determinación de la eficacia antihelmíntica se realizó en el día 30 p.i con el recuento de larvas totales, determinación de la media aritmética, desviación estándar, % de reducción, incremento de eficacia respecto al control tratado únicamente con el antihelmíntico y t-Student, considerándose significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

Farmacos	dosis	x	D.S	% reducec	t-Student <sup>1</sup>	I.EFIC	t-Student <sup>2</sup>
Control	-	55870	15268,8	-	-		-
ABZ	25	36463	12690,2	34,85	2,82***	-	-
ABZ/MTZ	25/1,5	35546,2	8412,54	38,16	3,49***	3,31	0,355*
ABZ/MTP	25/20	45821,8	15229,9	17,98	1,43*	0,00	-1,391*

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$ .

<sup>1</sup> t-Student realizada frente al control sin tratamiento.

<sup>2</sup> t-Student realizada frente al control tratado con albendazol.

ABZ =SIGEN\*-ABZ ( solución líquida albendazol genérico)

MTP = metirapona<sup>R</sup> MTZ = metimazol<sup>R</sup>.

### 6.5.2 Efecto de la asociación SIGEN-ABZ/MTP y SIGEN-ABZ/MTZ sobre Larvas enquistadas de T.spiralis.

En las tablas siguientes se recogen los resultados obtenidos de tratamiento de T.spiralis con solución líquida de albendazol genérico ( 25 mg/kg oral) en su administración conjunta con metimazol <sup>R</sup> (1,5 mg/kg, intramuscular) y metirapona <sup>R</sup> ( 20 mg/kg, subcutánea).

El tratamiento se realizó en los días 34, 35, 36 p.i.

La determinación de la eficacia antihelmíntica se realizó en el día 46 p.i con el recuento de larvas totales, determinación de la media aritmética, desviación estándar, incremento de eficacia respecto al control tratado únicamente con el antihelmíntico y t-Student, considerándose significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ .

Farmacos	dosis	x	D.S	% reduce	t-Student <sup>1</sup>	I.EFIC	t-Student <sup>1</sup>
Control	-	132058	28061	-	-	-	-
ABZ	25	74592	22195,5	43,5	4,29***	-	-
ABZ/MTZ	25/1,5	62520,7	16385	52,65	5,96***	9,15	1,209*
ABZ/MTP	25/20	69097,5	20909	47,67	4,97***	4,17	0,494*

\*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$ .

<sup>1</sup> t-Student realizada frente al control sin tratamiento.

<sup>2</sup> t-Student realizada frente al control tratado con albendazol.

ABZ =SIGEN\*-ABZ ( solución líquida albendazol genérico)

MTP = metirapona<sup>R</sup> MTZ = metimazol<sup>R</sup>.

La asociación solución líquida de albendazol/MTP o MTZ no produce una mejora significativa de la actividad antihelmíntica de esta formulación.



## **DISCUSSION**

Para comentar y relacionar los distintos resultados obtenidos, hemos dividido la discusión en los siguientes apartados:

- 7.1. T.spiralis, como modelo para la evaluación de Albendazoles genéricos.
- 7.2. Albendazol *versus* Ricobendazol en la quimioterapia de la Trichinellosis experimental.
- 7.3. Estudio comparativo de la actividad triquinelicida de las formulaciones galénicas de albendazol y ricobendazol.
- 7.4. Coadministración de albendazol e inhibidores microsomales hepáticos.

### 7.1. *T. spiralis* COMO MODELO PARA LA EVALUACIÓN DE ALBENDAZOLES GENÉRICOS.

A lo largo de este trabajo se han utilizado distintos lotes de albendazol, facilitados por la firma que ostenta la patente, denominado por nosotros "patrón" o "Genuino" y dos suministrados por otra casa comercial, denominado por nosotros "Genéricos" .

Tras el estudio de la actividad antihelmíntica de los distintos tipos de albendazol en las diferentes fases del ciclo biológico de *T. spiralis* , encontramos una mayor actividad para SKF-ABZ que para el primer lote de genéricos "GEN-ABZ". Esta diferencia resulta mas acusada cuando ambos albendazoles se utilizaban en la fase de enquistamiento muscular, ya que mientras que la administración de Gen-ABZ resultó ineficaz, tanto a la dosis de 50 mg/kg como 100 mg/kg, con la administración de SKF-ABZ, a estas mismas dosis, se obtuvieron eficacias de un 33,6 y 94,79 % respectivamente.

Cuando ambos albendazoles se administran en fase migratoria, es necesario duplicar la dosis de GEN-ABZ para obtener una eficacia similar a la obtenida con SKF-ABZ ( 41,14 % y 40,6 % tras la administración de 50 mg/kg de SKF-ABZ y 100 mg/kg. de GEN-ABZ respectivamente).

La eficacia de SKF-ABZ también fue superior a la de GEN-ABZ cuando estos se administraban a las 24 horas p.i, a la dosis de 5 mg/kg. Con SKF-ABZ se obtuvo una eficacia de un 16,5 % más, que tras la administración de GEN-ABZ a la misma dosis. Sin embargo conseguimos igualar actividades cuando se duplicaba la dosis de GEN-ABZ ( 62,75 % y 59,85 % de reducción con GEN-ABZ 10 mg/kg y SKF-ABZ 5mg/kg; 80,5 % y 96,77% de reducción, tras la administración de GEN-ABZ 20 mg/kg y SKF-ABZ 10 mg/kg respectivamente) o cuando GEN-ABZ se administraba en forma de dosis fraccionadas, (99,9 % de eficacia con GEN-ABZ 5 mg/kg fraccionadas similar a la administración de 10 mg/kg de SKF-ABZ).

Al trabajar con otros lotes de albendazol genérico (GEN\*-ABZ) se modificaron sus características y se obtuvieron resultados más acordes con los obtenidos tras la administración de albendazol patrón, aunque la eficacia se seguía manteniendo por debajo de éste, lo que nos hace pensar en un error de

síntesis en el primer lote de albendazol genérico, corregido en lotes posteriores.

El hecho de producirse un incremento tan acusado de la actividad antihelmíntica tras administrar el albendazol genérico (GEN-ABZ) en dosis fraccionadas, o mediante la administración de la formulación no cristalina de ambos albendazoles (eficacias del 100% con las soluciones líquidas de albendazol patrón y genérico en dosis de 2,5 mg/kg en preadultos, 47,86% y 60 % con SISKF-ABZ y SIGEN-ABZ dosis 50 mg/kg frente a larvas emigrantes y 95,5 % y 98,78 % con SIGEN-ABZ y SISKF-ABZ a la dosis 50 mg/kg frente a larvas enquistadas), nos hace pensar, aunque no hemos podido evidenciarlo cuantitativamente mediante las técnicas de análisis descritas, en la existencia de estructuras morfocristalinas no activas en la molécula de albendazol genérico.

Cuando se estudia el comportamiento biofarmacéutico y farmacocinético de ambos lotes de albendazol en el ratón, aparecen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en cuanto a  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , y ABC. Esto podría explicar las distintas actividades antiparasitarias obtenidas con ambos tipos de albendazol. El albendazol patrón es más activo que el albendazol genérico, lo que coincide con las mejores características biofarmacéuticas de éste, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros cuando el estudio se realizaba con las soluciones líquidas de ambos albendazoles, lo cual, podría ser un punto de apoyo para nuestra teoría de la existencia de formas polimórficas en la molécula de albendazol.

Otras diferencias han sido descritas por S. Torrado, 1994 en ambos lotes de albendazol, tras realizar estudios de DSC, HPLC y RX (Figs. 6, 8 y 9). Mediante el análisis por RX de ambas muestras de albendazol, se describe un peor grado de cristalización en el albendazol genérico. Por análisis cromatográfico se observó que, aunque ambos albendazoles coinciden en el tiempo de retención del pico mayoritario, el genérico tiene menor potencia, y presenta además un segundo pico. La presencia de picos endotérmicos (hombro en el pico endotérmico del albendazol  $T^a$  fusión) descrito mediante el análisis por DSC, puede justificarse por la existencia de anisótropos, polimorfos, isómeros ópticos, productos de degradación o algún producto intermedio de síntesis. Los barridos calorimétricos realizados cada 15 días durante 4 meses, no muestran un aumento de ninguno de los dos picos endotérmicos, por lo que se concluyó que

no son debidos a la presencia de distintas formas anisótropas.

Al no haberse detectado isómeros ópticos del albendazol (patrón y genérico) por polarimetría, este segundo pico puede ser atribuido a distintas formas polimórficas del albendazol (hecho común en los benzimidazol carbamatos), o a un producto de degradación o producto intermedio de síntesis del mismo. Para descartar la posibilidad de ser un producto de degradación S.Torrado, 1994, realizó un doble estudio, en el cual se demuestra la alteración química de la molécula de albendazol por la aparición de grupos cromóforos, después de someterlo a un ciclo de calentamiento. Al someter este mismo producto a un doble ciclo de calentamiento, se observa que la muestra se ha fundido perdiendo su estructura cristalina dando lugar a un producto de degradación amorfo que no recristaliza durante el segundo ciclo de enfriamiento, por lo que el 2º pico de fusión (238°C) del albendazol no puede ser atribuido a dicho producto de degradación.

En cualquier caso y como ocurre con otras sustancias como la quinidina, es importante tipificar perfectamente el producto, ya que existen diferencias entre lotes y suministradores; de hecho debido a las diferentes características de biodisponibilidad, por esta razón no deberíamos llamar genérico y patrón a los productos utilizados en nuestro estudio,, ya que no son bioequivalentes y el genérico, no lo es, aunque haya sido utilizado como tal.



## 7.2. ALBENDAZOL VERSUS RICOBENDAZOL EN LA QUIMIOTERAPIA DE T.spiralis.

El uso de la segunda generación de los benzimidazoles : Los metilcarbato de benzimidazol, en el tratamiento de las helmintiasis humanas y de animales, ha adquirido gran importancia, existiendo muchos compuestos encuadrados en este grupo. De sus aplicaciones terapéuticas se han derivado resultados muy satisfactorios y es por ello que estos fármacos, aparecen como sustancias de elección en algunas de las enfermedades producidas por nematodos.

Uno de estos carbamatos de benzimidazol es el albendazol, el cual se caracteriza por presentar un amplio margen terapéutico (  $DL_{50}$  para el ratón de 3000 mg/kg , determinada por Smith Kline and French labs., Philadelphia. P.a). En cuanto a eficacia, se han llevado a cabo estudios destinados a conocer la actividad del albendazol frente a parasitismos mas comunes en ganado ovino y vacuno, realizándose pruebas no solamente en ganado infestado experimentalmente, sino también en brotes naturales de infestación (Tabla 2). Todos estos estudios han confirmado que el albendazol manifiesta una actividad útil contra los parásitos gastrointestinales, vermes pulmonares, tenias y formas adultas de *Fasciola*.sp.

*Trichinella* spp. debido a su peculiar ciclo biológico, constituye uno de los modelos experimentales mas idóneos para el cribado de sustancias con un posible carácter antihelmíntico. La eficacia antihelmíntica de fármacos pertenecientes al grupo de los benzimidazoles frente al nematodo *T.spiralis*, en las distintas fases de su ciclo biológico, ha sido ampliamente estudiado (tabla 1); encontrando, al igual que nosotros, una mayor susceptibilidad a la terapia antihelmíntica, en las fases mas tempranas, es decir, en los estados inmaduros del parásito, que en estados siguientes. Una posible causa que justificaría este echo, sería la baja solubilidad de estos fármacos y como consecuencia una pobre absorción ( gran efectividad frente a parásitos intestinales) quedando expuesto el parásito durante largos tiempos a la acción del fármaco. Por el contrario, frente a parásitos tisulares y sistémicos es necesario administrar dosis altas o terapias

sostenidas, para alcanzar concentraciones eficaces. Aunque en el caso de mebendazol, se ha encontrado eficacias similares en el tratamiento de larvas enquistadas y preadultos de *T.spiralis* (Martinez-Fernández, 1979) aún cuando su solubilidad es limitada. La alta eficacia frente a larvas enquistadas se atribuye a una colaboración entre la inmunidad mediada por células (Hipersensibilidad tipo retardada), actuando sobre los quistes y el fármaco actuando sobre la larva. Este efecto no ha sido descrito en la terapia con albendazol.

Estudios sobre el metabolismo del albendazol, ponen de manifiesto la presencia de un metabolito activo "ricobendazol", al que, se le atribuye la actividad antiparasitaria, ya que albendazol es detectado mínimamente en sangre. Este hecho nos llevó a pensar en la posibilidad de aumentar la eficacia del albendazol, administrando ricobendazol directamente, y así conseguir una disminución en la dosis eficaz.

Ricobendazol, es un fármaco relativamente nuevo, hasta el momento no existen referencias bibliográficas sobre la utilización de éste, frente al nematodo *T.spiralis*; por lo que nos limitaremos a comparar su eficacia antihelmíntica con el albendazol de partida.

La primera fase del desarrollo de *T.spiralis* fijada como "blanco" de la terapia, la denominada estado de preadultos y la establecimos a las 24 horas p.i, es la mas sensible al tratamiento antihelmíntico. El efecto global del ricobendazol, va a depender del lote de albendazol utilizado como referencia; así, la administración de SKF-ABZ a la dosis de 10 mg/kg resulta un 18,75 % mas eficaz que ricobendazol administrado a la misma dosis, mientras que si la comparación la realizamos con GEN-ABZ, ricobendazol resulta un 15,74 % mas activo.

Cuando la dosis administrada se reduce a la mitad (5 mg/kg) las eficacias obtenidas para SKF-ABZ y RBZ son similares, mostrándose superiores a las obtenidas con GEN-ABZ (59,85% , 54,2 % y 43,5 % respectivamente). Si seguimos disminuyendo las dosis (administración de 2,5 mg/kg de albendazol y ricobendazol) la eficacia de ricobendazol es similar o ligeramente superior a SKF-ABZ y muy superior a la eficacia alcanzada con GEN-ABZ, (eficacia de

RBZ 22,8 % superior a la administración de GEN-ABZ) es decir, según vamos disminuyendo las dosis, la eficacia del RBZ va aumentando progresivamente hasta igualar o superar al albendazol. Ello probablemente es debido a una mayor solubilidad de este metabolito.

Frente a esta fase del parásito, antes de concluir una mayor o menor eficacia del ricobendazol frente al albendazol de partida, debemos tener en cuenta el comportamiento de ambos fármacos en el organismo:

- Por un lado, es bien sabido que en el metabolismo de albendazol se producen metabolitos más solubles, más polares y más fácilmente excretables, sin embargo, este proceso conlleva una disminución de la afinidad por la tubulinas del parásito, hecho que podría ser compensado por las mejores características biofarmacéuticas que presenta ABZSO, las cuales le permitirían alcanzar una mayor concentración en el parásito y ejercer su acción antihelmíntica.

- Por otro lado, tras la administración de ABZ se produce un rápido metabolismo de primer paso hepático a ABZSO, éste sufre reciclaje gastrointestinal por un proceso de distribución dependiente del Ph, pudiendo también ser segregado por la bilis. La alta eficacia de RBZ en parásitos gastrointestinales podría ser justificada por la existencia de un proceso de reducción del sulfóxido, por las bacterias gastrointestinales (Lanusse, 1992), al sulfuro correspondiente, producto más activo farmacológicamente. De hecho, eficacias similares en la terapia de nematodos de ovejas y vacas fueron obtenidas tras el tratamiento con ABZ o ABZSO (Mckellar y Scott, 1990).

También debemos tener en cuenta, que los fármacos fueron administrados con independencia de las comidas, con lo cual, el proceso de absorción puede ser modificado. Los alimentos pueden actuar como reservorios de los fármacos, haciendo que estos permanezcan durante más tiempo en el intestino y estómago, hecho favorable para la acción antihelmíntica de estos fármacos frente a nematodos intestinales. Sin embargo, este hecho dificulta el estudio de la actividad comparada de ABZ y RBZ, ya que estos fármacos estarían expuestos durante más tiempo a oxidaciones y reducciones a nivel gastrointestinal, lo que

haría imposible determinar si la acción de estos fármacos frente a preadultos es debida al sulfuro (ABZ) o al sulfóxido (ABZSO ó RBZ), aunque todos estos hechos hacen postular una acción conjunta de ambos fármacos.

Otro compuesto profármaco de ABZ, netobimin, resultó menos activo que ABZ frente a preadultos de *T.spiralis*, obteniéndose una eficacia del 17 % , cuando se administraba a ratones a la dosis de 20 mg/kg, 24 horas p.i. Esta eficacia aumentaba a un 65 % cuando se duplicaba la dosis (Baltar, 1989), similar a la alcanzada por nosotros al administrar GEN-ABZ 10 mg/kg y próxima a la obtenida tras administrar SKF-ABZ y RBZ en dosis de 5 mg/kg.

Un caso similar ocurre con otro carbamato de benzimidazol, el oxfendazol, el cual se metaboliza "*in vivo*" a fenbendazol. Oxfendazol parece ser mas activo que fenbendazol (Skarunakaran y Denham, 1980) y febantel (Bolás-Fernandez, 1981) frente a *T.spiralis*. Fernando y Denham, 1976 encontraron un % de reducción de un 1,8 % y un 10,7 % en el número de adultos tratados con fenbendazol a 50 mg/kg, mientras que oxfendazol a esta misma dosis reduce el número de adultos en un 41 % . Contra larvas emigrantes, fenbendazol fue un 89 % eficaz, mientras que oxfendazol fue un 99 % , sin embargo la diferencia mas acusada se observó en el tratamiento de larvas enquistadas, frente a las cuales, fenbendazol mostró un 3% de eficacia mientras que oxfendazol lo fue en un 98 % .

Comparando los efectos de febantel y fenbendazol administrados a ratones infestados con *T.spiralis* (Spaldonova, 1981) a las 24 horas p.i, febantel y fenbendazol causaron un 43,2 y 20,8 % de reducción a las dosis de 15 mg/kg. Cuando la dosis se incrementó a 50, 100 y 200 mg/kg no se encontraron diferencias significativas en cuanto a número de adultos recuperados.

Estas diferencias de eficacias encontradas por estos autores y comparables a las obtenidas por nosotros con albendazol y ricobendazol pueden ser resultado de la diferente farmacocinética de estas dos sustancias antes y después del proceso de absorción.

La segunda fase del desarrollo de *T.spiralis* "blanco" de nuestras

experiencias, la hemos establecido entre los días 13, 14 y 15 p.i y corresponde al estado de larvas emigrantes. Esta fase es quizás la más conflictiva, puesto que constituye un período bastante ambiguo, que resulta difícil de limitar y separar de la migración larvaria propiamente dicha y de la fase posterior, considerada como infestación muscular.

Es imposible estudiar la eficacia de los fármacos en este período, a menos, que efecto sobre la longevidad o fecundidad de los gusanos adultos pueda ser eliminado en el análisis experimental. Aunque las larvas son producidas en gran número en un período de tiempo corto, no es posible garantizar que un fármaco usado, por ejemplo, en el día 11 p.i no afectó a los gusanos adultos, alterando la producción de larvas. El tratamiento de los ratones después de la expulsión de los gusanos adultos (día 14 p.i) significa, el tratamiento de las larvas en su estado de desarrollo.

Neguvón<sup>®</sup>, elimina completamente los gusanos adultos remanentes, permitiendo que las larvas ya nacidas se dirijan hacia el músculo esquelético para su enquistamiento.

El tratamiento con albendazol y ricobendazol, posterior al tratamiento de los ratones con neguvón<sup>®</sup>, mostró la eficacia de ambos productos frente a larvas emigrantes de *T.spiralis*.

SKF-ABZ administrado a la dosis de 100 mg/kg resultó ser el más eficaz, con un porcentaje de reducción de un 19,76 % mayor que el efecto observado con el tratamiento con ricobendazol. La efectividad del tratamiento con ricobendazol aumentaba, como ocurría en el caso del ensayo realizado sobre la fase de preadultos, cuando disminuíamos la dosis; la administración de RBZ a la dosis de 50 mg/kg producía una eficacia similar a la administración de SKF-ABZ a igual dosis y GEN-ABZ en dosis 2 veces superior (Figura 13).

La eficacia de estos compuestos ha dado resultados satisfactorios (64 % y 40,4 % tras la administración de 100 mg/kg de SKF-ABZ y GEN-ABZ respectivamente, comparables al 50 % de eficacia obtenido sobre *T.spiralis* por Spaldonova y Corba, (1979) al aplicar la dosis de 100 mg/kg de albendazol, a

ratones en el período comprendido entre los días 8 y 11 p.i; y el 52,72 %, obtenido por A. Gómez Barrio, 1985, frente a *T.pseudospiralis*. Keittivuti.A, 1989, obtuvo una eficacia del 36,22 % cuando administró albendazol a ratones, a la dosis de 50 mg/kg, en los días 10, 11 y 12 p.i.

De los fármacos utilizados, los mejores resultados sobre la fase muscular del ciclo biológico de *T.spiralis*, que situamos entre los días 34, 35 y 36 p.i, al igual que ocurría en fases anteriores, se han obtenido con SKF-ABZ, con eficacia de un 29,21 % superior a la administración de RBZ a la misma dosis. Esta diferencia era menor cuando ambos productos se administraban a la dosis de 50 mg/kg (Fig 14). Este efecto podría ser explicado porque, aunque albendazol sulfóxido es considerado el responsable de la actividad antiparasitaria del albendazol, frente a estados tisulares (Marriner, 1980) ya que el producto de partida no se detecta en plasma; la administración oral, puede modificar la biodisponibilidad del ABZSO de forma que no se llegue a alcanzar niveles de concentración efectivos en las proximidades del parásito.

Comparando los resultados obtenidos del estudio farmacocinético realizados para ambos albendazoles y para el ricobendazol (Fig 15) en ensayos paralelos, administrados en dosis de 50 mg/kg a ratones, mediante un estudio conjunto llevado a cabo por los Departamentos de Tecnología Farmacéutica y de Parasitología de esta Facultad; encontramos que RBZ alcanza antes la Cmax, probablemente debido a su mayor solubilidad se produce una mejor disolución del fármaco en los fluidos gastrointestinales y consecuentemente una mejor y más rápida absorción.

Respecto a los parámetros Cmax y ABC<sub>0-6h</sub>, existen diferencias significativas entre los tres productos, así, en orden decreciente se obtienen valores de Cmax de : 26,83 ; 24,2 ; 12,8 µg/ml y valores de ABC<sub>0-6h</sub> expresados en µgh/ml de 84,19; 70,6 y 45,12 para SKF-ABZ, RBZ y GEN-ABZ respectivamente.

En vista de estos parámetros no es de extrañar, que la actividad antihelmíntica del ricobendazol resulte intermedia a la obtenida con ambos lotes

---

de albendazol; aunque en el caso de los ensayos realizados frente a preadultos y larvas emigrantes de *T. spiralis*, se obtienen eficacias muy similares para RBZ y SKF-ABZ. Cuando la terapia experimental va dirigida hacia larvas enquistadas, la diferencia de eficacia antihelmíntica de ricobendazol y albendazol se hace más evidente, resultando este último más eficaz.

Nuestros resultados pueden ser comparables a los obtenidos por Pérez Serrano, 1994, en un ensayo "*In vitro*" frente a protoexcólices de *E. granulosus*, quien obtiene actividades similares para ABZ y ABZSO, aumentando esta eficacia en la terapia conjunta.



### 7.3. EFICACIA ANTIPARASITARIA DE LAS NUEVAS FORMULACIONES GALENICAS DE ALBENDAZOL Y RICOBENDAZOL.

#### 7.3.1 SOLUCIONES LIQUIDAS.

Para la preparación de las soluciones líquidas de estos fármacos se utilizó el baño de ultrasonidos como técnica de disolución del albendazol en el vehículo. Para exaltar la solubilidad del albendazol, se recurre al empleo de cosolventes y tensoactivos; obteniéndose mejores resultados utilizando mezclas de transcuto<sup>R</sup> (aceite líquido soluble en agua con alto poder de solubilización del albendazol). La solubilidad del albendazol formulado como solución líquida con alto porcentaje de transcuto<sup>R</sup> (40%) en solución tampón (Ph 1,2), resultó mayor de 8 mg/ml (S.Torrado, tesis doctoral, 1994).

##### 7.3.1.1 Toxicidad aguda.

Este tipo de vehículos usados en la preparación tanto de emulsiones como de soluciones, suelen ser los responsables de la toxicidad de estas formulaciones (MERCH, 1989).

La DL<sub>50</sub> de transcuto<sup>R</sup>, administrado oralmente a ratas (informe de MERCH) es 8,69 g/kg. Para obtener las soluciones de albendazol a Ph 1,2 utilizadas en nuestros ensayos biológicos, se utilizó una dosis de transcuto<sup>R</sup> de 5 g/kg, correspondiente a la administración de 100 mg/kg de solución líquida de albendazol a ratones, conteniendo un porcentaje de transcuto<sup>R</sup> del 40 %.

Albendazol formulado como solución oral, fue bien tolerado a las dosis de 25 y 50 mg/kg (contenido de transcuto<sup>R</sup> 1,25 y 2,50 g/kg respectivamente). Sin embargo, la administración de esta solución a la dosis de 100 mg/kg (contenido de transcuto<sup>R</sup> 5 g/kg) causó efectos adversos graves como rigidez muscular que, en su consecuencia mas extrema, producía la muerte del 50 % de los animales de

experimentación en el primer día de tratamiento.

La muerte de los ratones debe ser atribuida a la toxicidad intrínseca del excipiente de la solución y no a la toxicidad intrínseca de la molécula de albendazol, ya que la suspensión de albendazol en carboximetilcelulosa, administrada a ratones en dosis iguales o superiores a 100 mg/kg, en ningún caso resultó letal para los ratones. Los efectos adversos observados después de la administración de la solución de albendazol deben ser asociados con el vehículo mas que con el propio fármaco.

### 7.3.1.2 Evaluación de la eficacia antihelmíntica.

Se efectúa un estudio comparado de los resultados obtenidos en los ensayos farmacológicos tras la administración de albendazol formulado como suspensión y solución a ratones infestados experimentalmente con  $300 \pm 50$  larvas de *T.spiralis*/ratón. El estudio farmacocinético de estas formulaciones en ratones (Figura 10), forma parte de la tesis doctoral de D<sup>a</sup> S.Torrado, 1994 (Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica), fruto de una línea de trabajo conjunta.

En el plasma de ratones, no se detectaron concentraciones significativas de albendazol, por lo que los ensayos farmacocinéticos fueron encaminados hacia la determinación del perfil farmacocinético del metabolito activo ABZSO.

En las formulaciones del albendazol genérico (suspensión y solución) aparecen diferencias significativas en los valores de  $ABC_{0-6h}$ , presentando el GEN-ABZ niveles plasmáticos menores que la solución correspondiente.

En la solución líquida se produce un desplazamiento de  $T_{max}$ , aparece antes; resultando menor de 1 hora, valor similar al obtenido por Martindale, 1993 en humanos, cuando la administración del medicamento se realizaba en ayunas. En otras especies animales se observa un  $T_{max}$  mayor cuando se administra junto a las comidas (Delatour y col., 1990a; Benoit y col., 1992). Estas diferencias pueden ser atribuidas al efecto del vaciamiento gástrico, sobre la

absorción de sustancias (Prieto y col.,1988).

La rápida absorción de la solución líquida del albendazol genérico (5,3mg/ml) administrada a la dosis de 50 mg/kg, puede ser la responsable de la baja actividad antiparasitaria obtenida con esta solución administrada a las dosis de 10 ,5 y 2,5 mg/kg frente a preadultos, con solo un 23,3 % de reducción en relación con el control no tratado (experiencia 1). En una segunda experiencia frente a este mismo estado, en la que se administró una solución líquida mas saturada de albendazol (concentración igual a 11,26 mg/ml) se obtuvieron eficacias del 100 % para las dosis de 10, 5 y 2,5 mg/kg, disminuyendo esta eficacia a un 15,4% cuando la dosis administrada se reducía a 1 mg/kg. Esta disparidad de resultados encontrados en dos experiencias totalmente iguales, a excepción de la concentración de la solución líquida administrada, debe ser producto de una modificación del proceso de absorción del fármaco, por un lado, y en menor medida, por el efecto del vaciamiento gástrico, ya que los medicamentos se administraran con independencia de las comidas y en mayor grado debido a que, en la segunda formulación, se forzaron las condiciones de solubilidad del albendazol en el vehículo, pudiendo haberse producido una precipitación del albendazol en el tracto gastrointestinal tras la administración oral, por un cambio en las condiciones del medio. Ello prolongaría el tiempo de permanencia del fármaco en el intestino, permitiendo alcanzar concentraciones eficaces en las proximidades del parásito.

Frente a larvas emigrantes la administración de GEN-ABZ formulado como solución líquida duplicó la actividad de GEN-ABZ, como demuestran los porcentajes de reducción del 60 % y 31 % alcanzados cuando SIGEN-ABZ se administra a las dosis de 50 y 25 mg/kg respectivamente, frente al 29,5 % obtenido con GEN-ABZ a dosis de 50 mg/kg.(Figura 19). Este incremento de actividad por parte de la solución líquida se puede atribuir a la mayor biodisponibilidad descrita con la nueva formulación "SIGEN-ABZ" (valores de  $ABC_{0-6h}$  obtenidos tras la administración de SIGEN-ABZ y GEN-ABZ a la dosis de 50 mg/kg, expresados en  $\mu\text{ghml}$  de 82,21 y 45,12 respectivamente) es decir, se produce un aumento en la biodisponibilidad del albendazol genérico formulado como solución líquida de un 54,4 % respecto a la suspensión del mismo.

El incremento de la biodisponibilidad relativa de la SIGEN-ABZ, no solo es debido a la mayor solubilidad de la formulación, ya que tras la administración oral a ratones y aunque la molécula de albendazol sea totalmente soluble en el solvente, esta puede precipitar en el medio gastrointestinal. La resolubilización del fármaco, resulta difícil por ser poco soluble en medios acuosos, sin embargo, el incremento en la biodisponibilidad y consecuente acción de esta nueva formulación sobre parásitos sistémicos, puede ser debido a la capacidad humectante del transcuto<sup>R</sup>, produciendo una diseminación del precipitado por el tracto gastrointestinal, con la consecuente liberación del principio activo. Este hecho fue descrito anteriormente por Shaaya, y col., 1992, con otros fármacos poco solubles. Otra explicación radica en el efecto promotor de la absorción descrito en la administración transdérmica de formulaciones conteniendo transcuto<sup>R</sup> (Bovina, 1993); efecto que explicaría también el gran éxito obtenido con esta nueva formulación de albendazol frente a larvas enquistadas de *T. spiralis*, ya que se alcanzan porcentajes de reducción próximos al 100 % cuando se administra SIGEN-ABZ en dosis de 50 mg/kg (4,5 % de larvas recuperadas de las cuales el 50,6% estaban muertas) (Figura 22), lo que facilitaría el acceso del albendazol al interior del quiste.

Frente a larvas enquistadas la administración de GEN-ABZ en dosis de 50 mg/kg resultó ineficaz, mientras que la administración de SIGEN-ABZ en dosis de 25 mg/kg mantenía eficacias por encima del 30 % .

Respecto a la utilización de la solución líquida de SKF-ABZ en las distintas fases del ciclo biológico de *T. spiralis* encontramos:

1.- Frente al estado de preadultos se obtuvieron eficacias del 100 % cuando SISKF-ABZ (10,86 mg/ml) se administraba a las dosis de 10, 5 y 2,5 mg/kg, con un efecto similar al observado con SIGEN-ABZ (11,26 mg/ml) en esta fase. Cuando la dosis administrada se reducía a 1 mg/kg el % de reducción para la SISKF-ABZ fue un 9,2 % mayor que para la SIGEN-ABZ a esta misma dosis, ello seguramente debido a la mayor actividad antiparasitaria descrita para el albendazol patrón.

2.- Frente a larvas emigrantes, la administración de 50 mg/kg de

SISKF-ABZ mostró un nivel de eficacia similar (alrededor del 40%) al obtenido con la suspensión de SKF-ABZ administrado a igual dosis, sin embargo se produjo un incremento del 10% en el número de larvas muertas recuperadas, lo que supone una ligera mejora de eficacia tras la administración de la solución, además la eficacia se mantenía al reducir la dosis a 25 mg/kg (figura 20).

3.- Frente a larvas enquistadas, al igual que ocurría con SIGEN-ABZ, se obtuvieron los resultados más satisfactorios; tras la administración de dosis de 25 mg/kg la eficacia se mantenía por encima del 50%, alcanzándose niveles próximos al 100% cuando se duplicaba la dosis.

Estos resultados son fácilmente explicables si nos basamos en el comportamiento farmacocinético comparado de la solución y la suspensión de SKF-ABZ (Figura 11); pues no se encontraron diferencias significativas en cuanto a ABC ( $p > 0,05$ ) entre ambos productos.

El valor de  $C_{max}$  es significativamente mayor para la solución líquida ( $p < 0,05$ ), debido a la mayor solubilidad del albendazol en el vehículo y al efecto promotor de la absorción del transcutol, lo que facilitaría el acceso del fármaco al interior del quiste, reflejándose en un aumento en la acción antiparasitaria frente a larvas enquistadas.

La diferencia de eficacia comparada entre la solución líquida y la suspensión de SKF-ABZ, resulta menor que en el caso de la solución y suspensión de GEN-ABZ, debido a las mejores características biofarmacéuticas del albendazol patrón.

Por último hacer hincapié, en la similitud de comportamiento tanto farmacológico como farmacotécnico de la solución líquida de ambos albendazoles. Ausencia de significación entre los parámetros farmacocinéticos observados ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , ABC) y similitud en la eficacia antiparasitaria frente a *T. spiralis*, en las diferentes fases del ciclo biológico, diferencias que si aparecen entre los productos nativos, lo que reafirma la hipótesis de la presencia de polimorfos inactivos en la molécula de GEN-ABZ, eliminados con la formulación de soluciones líquidas.

En lo referente a la nueva formulación de ricobendazol, objeto de estudio, se muestra claramente superior al ricobendazol nativo, tanto frente a la fase de preadultos como frente a larvas enquistadas de *T. spiralis*. En ambos casos y a igualdad de dosis, SIRBZ revela mayores niveles de eficacia (figura 17 y 23). Frente a la fase de preadultos, una dosis de SIRBZ de 10 mg/kg proporciona una reducción del 100 %, mientras que con la misma dosis de RBZ tan solo se consigue un 78 % . Del mismo modo, tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg se registra una eficacia del 47,84 % con SIRBZ y del 26,7 % con RBZ. La eficacia de RBZ administrado a 1 mg/kg es nula, mientras que ésta se mantiene superior al 30 % cuando está formulado como solución líquida. La explicación sería la misma que para las soluciones líquidas de ABZ, en las cuales se suponía la formación de precipitado insoluble, en fluidos gastrointestinales, tras la administración oral.

Frente a larvas enquistadas la administración de la SIRBZ duplica la actividad de RBZ (23,32 % de reducción alcanzado con SIRBZ, en dosis de 25 mg/kg y RBZ, en dosis de 50 mg/kg). El incremento de eficacia más notable se produce tras la administración de 50 mg/kg de SIRBZ, dosis a la que se obtienen eficacias próximas al 100 %.

Respecto a larvas emigrantes, la administración de SIRBZ duplica la actividad del RBZ.

De lo hasta aquí expuesto, se concluye que la actividad antihelmíntica, tanto del albendazol como del ricobendazol, se ve incrementada por esta nueva formulación galénica, hecho que puede atribuirse a su mayor solubilidad, junto con el efecto promotor de la absorción del transcutol<sup>R</sup>, parámetros que influyen directamente en la biodisponibilidad de los fármacos.

Con esta nueva formulación se puede conseguir una acción más pronunciada, lo que podrá ofrecer obvias ventajas sobre albendazol y ricobendazol en el tratamiento de helmintos tisulares. Así mismo, resulta un recurso farmacotécnico muy útil para la formulación de sustancias caracterizadas por la presencia de formas cristalinas inactivas en su molécula.

### 7.3.2 DISPERSIONES SOLIDAS.

Cuando un fármaco poco soluble en agua, se administra por vía oral, la velocidad de absorción se encuentra controlada por su velocidad de disolución en el tracto gastrointestinal, en el caso de las dispersiones sólidas, mejora la biodisponibilidad de los medicamentos poco solubles.

Un inconveniente que presenta esta nueva formulación, es la limitada estabilidad física en el tiempo, debida a la higroscopicidad, lo que le hace evolucionar hacia una forma más estable y por lo tanto existe una tendencia a pasar de una forma amorfa, más soluble, a cristal. Esta evolución se puede ver reflejada en los resultados del análisis calorimétrico diferencial realizados a distintos tiempos (S. Torrado, 1994). En nuestro caso, la pérdida de estabilidad física se produce a los tres meses, siempre que se almacene en condiciones de ausencia de luz y humedad.

El método de obtención de las dispersiones sólidas fue el de los cosolventes. La formulación de solubilidad mas exaltada resultó ser albendazol/kolindón<sup>®</sup> 12, 1:40, hecho por el cual se seleccionó para las pruebas farmacológicas, sin embargo, la necesidad de utilizar elevadas concentraciones de fármaco, requería el uso de grandes cantidades de producto disuelto en pequeños volúmenes de agua, por lo que decidimos utilizar la misma dispersión, pero en el porcentaje 1:20. En las pruebas farmacológicas preliminares no se encontró diferencia de eficacia entre ambos productos.

Albendazol formulado como dispersión sólida, fue bien tolerado en todas las dosis administradas.

### 7.3.2.1 Evaluación de la actividad antihelmíntica.

Al igual que para las soluciones líquidas, se efectúa un estudio comparado de los resultados obtenidos en los ensayos farmacológicos, tras la administración de albendazol y ricobendazol formulado como suspensión y dispersión a ratones infestados experimentalmente con *T.spiralis*.

Frente al estado de preadultos se produce un incremento en la actividad antihelmíntica del albendazol cuando este se administra en forma de dispersión. Aunque este incremento de eficacia es superior para la DsGEN-ABZ ( se obtiene una eficacia un 20 % superior al producto puro a las dosis de 5 y 10 mg/kg), los mejores resultados se obtienen con DsSKF-ABZ ya que se producen eficacias próximas al 100 % a la dosis de 5 mg/kg. (figura 16 y 17).

También es de destacar la eficacia superior al 30 % obtenida cuando ambas dispersiones se administran a la dosis de 1 mg/kg, mientras que con los productos puros, la actividad es mínima a la dosis de 2,5 mg/kg.

Como ocurría en el caso del ricobendazol administrado como solución y suspensión, al administrarlo como dispersión se obtuvieron eficacias similares a la DsSKF-ABZ.

Esta nueva formulación fue utilizada con anterioridad por Martínez Fernández y col, en 1990 , utilizando en este caso mebendazol. Esta formulación se mostraba claramente superior al mebendazol clásico, tanto frente a la fase de preadultos como sobre larvas enquistadas de *T.spiralis*. Frente a preadultos, una dosis de 3 mg/kg proporciona una reducción del 94 % ( cuando el antihelmíntico se administraba en dosis fraccionadas a las 20, 24 y 28 horas p.i) ó 97 % en dosis única, administrada a la 24 horas p.i, mientras que con la misma dosis de mebendazol solo se consigue un 52 %, en dosis única o fraccionada, tras la administración de una dosis de 1 mg/kg (dosis única), se registra una eficacia del 63 % con la dispersión sólida de mebendazol y del 26 % con mebendazol, lo que supone un incremento de eficacia del 37 % , incremento similar al obtenido por nosotros tras administrar la dispersión de albendazol a la dosis de 1 mg/kg.

El estudio farmacocinético de estas formulaciones se muestra en la figura 10 y 11. En el caso del albendazol genérico, las dispersiones sólidas, afectan a la biodisponibilidad de éste calculada en función del  $ABC_{0-6h}$ , produciéndose un aumento de un 237,3 %, así como del  $C_{max}$ , que también aumenta ( $p < 0,001$ ) en un 238,5 %; sin embargo el  $T_{max}$  no varía ( $p > 0,005$ ). Estos efectos no son tan claros en el caso de SKF-ABZ, ya que por sí mismo, posee unas buenas características biofarmacéuticas en comparación con el genérico, la única diferencia observada es en cuanto a  $T_{max}$ , que aparece antes en la dispersión sólida del albendazol patrón ( $p < 0,005$ ).

Frente a larvas emigrantes con la administración del albendazol genérico en forma de dispersión a la dosis de 50 mg/kg, se obtiene un buen nivel de eficacia, equiparable a la administración de 100 mg/kg de producto puro (figura 19), hecho que se debe a que la dispersión sólida aumenta la solubilidad del fármaco, ya que durante el proceso de solidificación de la misma, la polivinilpirrolidona si, se encuentra en una proporción suficiente en relación con el principio activo, no le deja cristalizar y se obtiene así una forma amorfa más soluble y con mejor biodisponibilidad, efecto observado en el incremento del  $ABC_{0-6h}$  producido con la dispersión sólida.

Sin embargo, cuando la DsGEN-ABZ se administra a la dosis de 100mg/kg los resultados no son tan satisfactorios, ya que solo se produce un incremento de eficacia de aproximadamente un 8% en relación con la administración de la mitad de dosis, probablemente debido al efecto aglutinante de la polivinilpirrolidona, más patente a esta dosis, o al fenómeno de sobresaturación, ya que se ha aumentado la cantidad de producto sin modificar el volumen de vehículo. Este hecho hace que se retrase la velocidad de disolución y como consecuencia la biodisponibilidad del albendazol se vea afectada.

Al utilizar SKF-ABZ en forma de dispersión sólida, en esta fase del ciclo biológico del parásito, no se produce una mejora en la eficacia comparada con el producto puro (figura 20), sin embargo se produce un incremento en el porcentaje de larvas muertas recuperadas. Este efecto es explicable por las mejores características biofarmacéuticas del SKF-ABZ y el similar perfil

---

farmacocinético que presentan estas dos formulaciones.

En el caso del ricobendazol, la administración de éste en forma de dispersión no mejora su eficacia.

Frente a larvas enquistadas, no se obtuvieron resultados tan satisfactorios como con las soluciones líquidas. En el caso de la DsGEN-ABZ aunque se produce una mejora en la actividad, esta no supera el 30 %.

En un estudio de la eficacia límite del mebendazol sobre larvas enquistadas (Martínez Fernández y col, 1979), se señaló que tres dosis sucesivas de 10 mg/kg/día producían la muerte del 100 % de las larvas; tres dosis de 5 mg/kg reducían su número en un 48 %. Con la dispersión sólida de mebendazol esta segunda pauta de tratamiento se revela un 100 % eficaz (Martínez Fernández, 1990). La diferencia entre ambas formulaciones es aun mas acusada cuando el antihelmíntico se administra en una sola dosis de 10 mg/kg; este tratamiento con mebendazol no reduce significativamente el número de larvas, mientras que con la dispersión de mebendazol se obtiene un 93 % de reducción, resultado superiores a los obtenidos por nosotros debido a una mejor solubilidad del mebendazol y la consiguiente repercusión sobre su biodisponibilidad.

En lo referente a esta nueva formulación, tanto de albendazol como de ricobendazol objeto de estudio, se concluye que aunque resulta un buen antihelmíntico frente a parásitos intestinales, esta no resulta tan eficaz para el tratamiento de parásitos sistémicos y tisulares.

#### 7.4. COADMINISTRACIÓN DE ALBENDAZOL E INHIBIDORES MICROSO-MALES HEPATICOS.

La rápida aparición del sulfóxido de albendazol en plasma es atribuible a un efecto de primer paso hepático, previo a la absorción del albendazol; hecho por el cual el albendazol solo se detecta en sangre en trazas. La coadministración de albendazol más metirapona<sup>R</sup> (MTP) o metimazol<sup>R</sup> (MTZ) a ratones, no parece afectar a la disposición del albendazol; sin embargo tanto MTP como MTZ a través de su metabolito, actúan bloqueando el citocromo P450, a consecuencia de lo cual, se produce una disminución del efecto de primer paso hepático, con enlentecimiento del proceso de sulfonación y aumento del tiempo de reciclaje plasma- fluido gastrointestinal de ABZSO, lo cuál, permitiría una reducción al compuesto de partida y una posible presencia de éste en plasma.

El efecto de MTZ y MTP en el proceso de sulfoxidación del albendazol varia cuantitativamente en las distintas especies animales, siendo significativamente menor en ganado bovino que en ovinos, a igual concentración de MTZ (Lanusse y col., 1993). También se han descrito diferencias en cuanto a la dosis administrada (Lanusse y Prichard, 1991); por lo que nuestros resultados resultan difícilmente comparables cuantitativamente, con los obtenidos por otros autores, al haber utilizado distinto modelo experimental (ratones), dosis y vías de administración.

Los ratios ABC ABZSO/ABZ y ABC ABZSO/ABZSO<sub>2</sub>, resultan buenos indicadores de la modificación de la oxidación hepática del ABZ y la relativa abundancia de sus metabolitos en plasma.

En nuestras experiencias no hemos podido detectar la presencia de ABZ en plasma, así como, tampoco nos fue posible la determinación de ABZSO<sub>2</sub>, aunque actualmente estamos poniendo a punto una nueva columna que nos permita la separación de ambos metabolitos. Por ello, nos limitaremos a realizar un análisis cualitativo y especulativo de la influencia de los inhibidores en la modificación de estos cocientes.

El ratio ABC ABZSO/ABZ nos indicaría una mayor biodisponibilidad

del metabolito ABZSO, ya que los ABCs de ABZSO obtenidos tras el tratamiento con MTP y MTZ son significativamente mayores a los obtenidos tras el tratamiento con ABZ solo (ABC ABZ en los tres casos lo suponemos similar ya que no se detectó en ningún caso en plasma), lo que indicaría un aumento del cociente anterior; aún más, el incremento en el tiempo de residencia del ABZSO, así como las altas concentraciones plasmáticas de ABZSO en tiempos tardíos, tras el tratamiento con ambos inhibidores, nos permite postular un retraso en la aparición de la sulfona (metabolito inactivo), lo cual se reflejaría en un incremento en el cociente ABZSO/ABZSO<sub>2</sub>, en concordancia con lo expuesto por Lanusse y col (1991), tras coadministrar MTP ó MTZ con netobimin. En consecuencia, cabe esperar un aumento en la actividad antiparasitaria de estas asociaciones, debido a una mayor permanencia del metabolito activo, ABZSO, en el organismo.

Mientras que las flavín monooxigenasas son las responsables de la sulfoxidación microsomal de ABZ a ABZSO en ovejas (Galtier y col, 1986) y ratas (Fargetton y col, 1986). El sistema del citocromo P450, en una reacción bifásica, es el responsable de la aparición de la sulfona. MTP es un potente inhibidor de la actividad enzimática del citocromo P450 (Tynes y col, 1983) "*in vivo*" no siendo así "*in vitro*", lo que parece indicar que los cambios observados en la farmacocinética del ABZ en presencia de MTP son debidos, "*in vivo*", a una interferencia con la formación de la sulfona (Lanusse, 1991)

Debido a que el grupo R-SO-R' ofrece un centro de asimetría, dos enantiómeros antípodos de ABZSO son posibles: (+) y (-) ABZSO, los cuales, basándonos en la terapéutica estereoquímica de otras sustancias, probablemente tienen efectos biológicos distintos. El balance de los enantiómeros de ABZSO ha sido estudiado en rumiantes ( Delatour y col, 1991) y en animales monogástricos, incluyendo el hombre ( Delatour y col, 1991b). En las distintas especies animales se han encontrado diferencias en el ratio de los dos enantiómeros, debido a la relativa contribución de FMO y citocromo P450 a la sulfoxidación del albendazol (Delatour, 1991), sugiriendo que (-) ABZSO es substrato del citocromo P450, mediado en la formación de la sulfona, lo cual se correlaciona con un aumento lineal de la proporción de (+) ABZSO. En nuestras experiencias, coincidiendo con otros autores, (Lanusse y col, 1991) suponemos que el

efecto del MTP en la oxidación de ABZ, está relacionado con la producción de (-) ABZSO y formación de la sulfona, es decir, la administración de ABZ/MTP produciría un incremento en el enantiomero (+) y una disminución en la formación de (-) ABZSO y ABZSO<sub>2</sub>, por bloqueo del citocromo P450; según esto, en nuestra curva de concentraciones plasmáticas/tiempo (Figura 28) de ABZ 100/MTP 30 (1 dosis), el aumento progresivo de la concentración de ABZSO entre los tiempos 0-12 horas, sería mayoritariamente debido al (+) ABZSO, mientras que en tiempos superiores a 12 horas, el incremento en las concentraciones plasmáticas de ABZSO, se atribuyen al bloqueo de la formación de sulfona.

El mismo comportamiento se observa tras administrar ABZ 50 /MTZ 3 a ratones "dosis única" (figura 27). Sin embargo, la contribución relativa de ambos enantiomeros a la concentración de ABZSO total, sería distinta. MTZ es sustrato de FAD (Tynes, 1983), sistema enzimático encargado de la formación del enantiomero (+). También se le atribuye en su biotransformación, un metabolito que se puede unir al citocromo P450, bloqueando la entrada de otros sustrato (Kedderis, 1985). Basándonos en estos hechos, en nuestro estudio farmacocinético observaríamos un incremento en las concentraciones plasmáticas de ABZSO entre los tiempos 0-12 horas, cuya mayor parte correspondería al (-) ABZSO. A partir de las 12 horas, se produciría un incremento en las concentraciones plasmáticas de ABZSO, debido al bloqueo del citocromo P450 implicado en la formación de la sulfona. La administración de MTZ atenúa el efecto de primer paso hepático (retrasando el proceso de sulfoxidación), a consecuencia de lo cual, se prolonga el tiempo de reciclaje plasma-fluidos gastrointestinales de ABZSO, con la consiguiente reducción a ABZ. Esto haría que el albendazol debiera alcanzar otra vez el hígado para oxidarse a ABZSO y posteriormente a sulfona, es decir, se produciría un enlentecimiento en la formación de sulfona. Este efecto fue observado por Lanusse y col. (datos obtenidos de una publicación de 1991), con la coadministración de netobimin junto MTP o MTZ, produciendo una mejora en la biodisponibilidad de ABZ y ABZSO. Aunque albendazol no se detecta en plasma, un retraso en la oxidación es suficiente para modificar el perfil farmacocinético de ABZSO e incrementar el ratio ABC ABZSO-/ABZSO<sub>2</sub>.

Una vez determinado el papel del MTP y el MTZ en la enantioselectividad del ABZSO, explicado por el distinto mecanismo de actuación de los inhibidores utilizados, pasaremos a comparar las modificaciones producidas en el comportamiento farmacocinético y farmacológico del albendazol, tras la terapia conjunta con inhibidores, haciendo hincapié en las diferencias producidas, asociadas a los diferentes regímenes de dosificación.

Tras la administración de ABZ 50 mg/kg + MTP 30 mg/kg, se observa una disminución en la concentración plasmática de ABZSO. Este hecho podría ser explicado en base a:

- Una posible inducción enzimática por parte del ABZSO, debido a las altas concentraciones de este metabolito, lo que produciría un aumento en la biosíntesis del citocromo P450

- Una interacción de tipo competitivo entre el fármaco y el inhibidor, traducido en un desplazamiento del inhibidor de su sitio de unión al citocromo P450, haciendo posible la sulfonación.

- Kato en 1962, sugirió que SKF-525A podría tener un efecto inhibidor "inmediato", manifestándose un efecto inductor del metabolismo hepático "posterior"; el efecto inductor inicial sería el responsable del incremento compensatorio, en la biosíntesis de *novo* de enzimas metabólicas. Este efecto puede ser compartido por el MTP ya que ambos productos muestran similar mecanismo de bloqueo.

Al administrar a ratones ABZ 100 mg/kg + MTP 30 mg/kg, el aumento de las concentraciones plasmáticas de ABZSO es más progresivo, no alcanzando en ningún momento concentraciones plasmáticas superiores a las alcanzadas tras el tratamiento con ABZ 50 mg/kg + MTP 30 mg/kg, posiblemente debido a que la dosis de albendazol utilizada en este caso, permite una sulfoxidación parcial, ya que el citocromo P450 dispondrá de lugares activos no ocupados por el inhibidor, evitando así, concentraciones plasmáticas de ABZSO suficientes para desplazar al inhibidor con la consecuente autoinducción del metabolismo.

Cuando utilizamos como inhibidor el MTZ, el comportamiento farmacocinético al administrarlo junto con ABZ 50 y 100 mg/kg, es el inverso al obtenido con MTP. Aunque las razones pueden ser análogas a las expuestas para MTP, no podemos concluir que así sea pues, al tratarse de una sustancia

distinta, actuando por un mecanismo supuestamente distinto, relacionado con una primera inhibición del sistema de FMO y un bloqueo complementario de la actividad del citocromo P450, sería necesario realizar un estudio más exhaustivo de las combinaciones fármaco/inhibidor.

Ambos tratamientos ABZ+MTP y ABZ+MTZ producen cambios sustanciales en el perfil farmacocinético de ABZSO, en comparación con el tratamiento control (ABZ). Las concentraciones plasmáticas de ABZSO resultaron significativamente mayores, con incrementos de ABCs de 289,8 % para ABZ 100 mg/kg + MTP 30 mg/kg y de 418 % para ABZ 50 mg/kg + MTZ 3 mg/kg,, respecto a los tratamientos control. C<sub>max</sub> y el tiempo de residencia de ABZSO también resultaron significativamente mayores en ambos tratamientos (Figuras 27 y 28), lo que deberá traducirse en un aumento en la actividad farmacológica de estas asociaciones, en comparación con la terapia única. Este hecho fue comprobado por nosotros en el modelo *T. spiralis* / ratón, obteniendo incrementos de eficacia de un 41,23 % ( $p < 0,001$ ) para ABZ 50/MTZ 3 y 47,50 % ( $p < 0,001$ ) para ABZ 100/MTP 30, cuando ambos se administraban en una dosis, en el estadio de larvas emigrantes (Tabla 38); 35,37 % ( $p < 0,05$ ), para ABZ 50/MTZ 3 y 40,3 % ( $p < 0,05$ ) para ABZ 100/MTP 30, cuando el tratamiento se realizó sobre larvas enquistadas (tabla 40).

Investigar el efecto de repetidas dosis de estas asociaciones de fármaco/inhibidor, en la evolución de las concentraciones plasmáticas de ABZSO resulta interesante, dado el efecto inductor enzimático del albendazol observado por Souhaili-El-Amri y col.1988, en ratas, tras la administración de dosis repetidas de albendazol durante 10 días y el perfil farmacocinético observado en cabras, tras la administración de tres dosis consecutivas de albendazol cada 24 horas (Benoit y col.,1992), en ambos casos, atribuido a un aumento en el proceso de sulfonación. Así, en nuestras experiencias la administración de dosis repetidas, 3 días de tratamiento, con ABZ (50 y 100 mg/kg) más MTP 30 mg/kg y MTZ 3 mg/kg, produce una modificación en las concentraciones plasmáticas, que para la dosis de ABZ 100 mg/kg/MTP 30, supone una disminución en el ABC<sub>0-48h</sub>, respecto, al mismo tratamiento administrado una sola vez (Figura 30). El mismo estudio comparativo entre la administración de ABZ 50/MTZ 3, revela un efecto similar (Figura 31A). Estas fluctuaciones en el ABC de ABZSO, producidas en

la terapia continuada durante 3 días, podrían ser atribuidas al efecto anterior.

Partiendo de estos resultados, cabe esperar que la administración conjunta de una dosis adecuada tanto de fármaco como de inhibidor en dosis única, mejore considerablemente la eficacia antihelmíntica del albendazol.

En la terapia experimental frente a larvas emigrantes de *T. spiralis* se alcanza un incremento de eficacia de un 41,23 % en la terapia conjunta albendazol 50 mg/kg/MTZ 3 mg/kg, en dosis únicas, respecto a la administración de albendazol solo  $p < 0,01$ . Este incremento resulta ser similar al alcanzado al administrar albendazol durante 3 días consecutivos (figura 32).

La administración de albendazol/metirapona en dosis únicas (un día de tratamiento), supone una actividad antihelmíntica (56,55%) similar a la administración de la misma dosis durante 3 días (65,81 %)  $p > 0,05$  (figura 33).

Cuando estas asociaciones de fármacos fueron utilizadas frente a larvas enquistadas de *T. spiralis* se obtuvieron resultados menos optimistas, en cuanto al reemplazo de la terapia continuada, durante tres días, por la terapia única (figuras 34 y 35). Sin embargo, los resultados obtenidos con la terapia conjunta albendazol/inhibidor, sí resultan satisfactorios respecto al tratamiento con albendazol solo, ya que se obtuvieron eficacias superiores al 50 % con la terapia conjunta (51,12% de reducción, en el caso de ABZ 50/MTZ 3 mg/kg y un 62,42 % con ABZ 100/MTP 30 mg/kg), llegando a alcanzarse eficacias superiores al 80% al administrar ABZ 100 +MTZ 3mg/kg y ABZ 75 + MTP 30 mg/kg (figura 26).

Las mejoras obtenidas en cuanto a eficacia se refiere, tras la terapia conjunta fármaco/inhibidor, no cabe duda que son debidas a una mejora en las características farmacocinéticas del ABZSO. Los mejores resultados obtenidos frente a larvas emigrantes podrían ser consecuencia de una mayor concentración en suero del metabolito activo frente a las concentraciones alcanzadas en el músculo esquelético; hecho contrario al observado en el caso de que el inhibidor utilizado sea la cimetidina, el cual, puede ser mejor absorbido en el tejido hepático y en el sistema biliar que en el torrente sanguíneo. Esto podría explicar,

el porqué se produce un aumento de las concentraciones biliares y en el fluido quístico, pero no en suero, tras el tratamiento de *Echinococcus*, en humanos, con albendazol y cimetidina (Wen y col., 1994).

Concluyendo, la administración de albendazol junto con inhibidores de su metabolismo, produce una mejora en las características farmacocinéticas de éste, hecho reflejado en un aumento en los parámetros biofarmacéuticos siguientes:  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-48h}$ , así como, un aumento en la actividad antihelmíntica frente a parásitos sanguíneos y tisulares.

Una alternativa a la terapia única con albendazol durante tres días consecutivos de larvas migratorias, puede ser la combinación de albendazol junto con metimazol<sup>R</sup> ó metirapona<sup>R</sup> (dosis 3 mg/kg y 30 mg/kg respectivamente) administrados en una única dosis, mientras que para el tratamiento de larvas enquistadas resulta más útil la administración de albendazol más inhibidores durante tres días consecutivos.

En ambos casos, el incremento de eficacia obtenido es superior cuando el inhibidor utilizado es el metimazol<sup>R</sup>., aunque se alcanzaron actividades antihelmínticas superiores en el caso del MTP.

Experiencias con benzimidazoles, indican que la baja solubilidad, es la causante de la gran variabilidad en su absorción y por lo tanto, en la respuesta farmacológica en distintas especies animales, incluyendo el hombre.

La clave para intentar mejorar la actividad antiparasitaria de los benzimidazoles, estaría relacionada con un aumento en la biodisponibilidad oral de estos. Una forma ejemplificada por la terapia combinada con cimetidina (Wen, 1994), metirapona<sup>R</sup> y metimazol<sup>R</sup> en nuestro caso, sería mediante la alteración de su metabolismo; otra forma sería mediante el aumento del proceso de absorción y distribución a tejidos, por nuevos sistemas de liberación (liposomas..) o, en nuestro caso, mediante nuevas formulaciones galénicas (dispersiones sólidas, soluciones líquidas).

Nuestros estudios preliminares en animales de experimentación,

demonstraron que ambos, administración de moduladores metabólicos y nuevas formulaciones, alteran la cinética y biodisponibilidad del albendazol, así como, establecen una mejora de la actividad antiparasitaria. Estos resultados animan a una mejora en la farmacología del albendazol, mediante la optimización de la terapia combinada de nuevas formulaciones de albendazol + modulador metabólico, aunque en nuestras experiencias, la coadministración del albendazol formulado como solución líquida, a la dosis de 25 mg/kg junto con metimazol<sup>R</sup> 1,5 mg/kg o metirapona<sup>R</sup> 20 mg/kg no produjo mejora de la actividad antihelmíntica frente a larvas migratorias. En el caso del tratamiento de larvas enquistadas con SIGEN-ABZ 25 mg/kg más metimazol<sup>R</sup> 1,5 mg/kg, se apreció un ligero aumento de la actividad antihelmíntica, manteniendo una eficacia superior al 50 % .

Aunque el efecto sinérgico en el caso de SKF-525A ha sido un éxito, su uso se ha restringido únicamente al campo experimental. La administración crónica de SKF-525A ha sido asociada a la hepatotoxicidad observada en ratas (Tognoli y col,1959), tras la administración de dosis superiores a 10 mg/kg/día y en perros (Dick y col,1960). Holmes y Bentz en 1960, explican este efecto, porque la interferencia de este inhibidor en un coenzima Q, implicado en la transferencia electrónica, induce la acumulación de material lipídico en el hígado de los animales. Este efecto no ha sido observado por nosotros, en el caso de la administración de MTP o MTZ.

## **CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES.

### PRIMERA

Mediante el empleo de *Trichinella spiralis*, como modelo experimental para la valoración de compuestos genéricos de albendazol, se ha detectado la no bioequivalencia, entre un genérico y el producto que ostenta la patente. Esta no bioequivalencia podría ser debida a la existencia, en el compuesto genérico, de polimorfos inactivos.

### SEGUNDA.

Del estudio de eficacia comparada de albendazol (ABZ) y ricobendazol (RBZ), frente a tres estados del ciclo biológico de *Trichinella spiralis* se concluye que, frente a preadultos y larvas emigrantes, la eficacia de ambos productos resulta similar, sobre todo a dosis bajas. Frente a larvas enquistadas, ABZ resulta ser mas activo. Estos resultados se corresponden con los parámetros farmacocinéticos ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$  y  $ABC_{0-6h}$ ), obtenidos para ambos fármacos.

### TERCERA.

La formulación de soluciones líquidas de ABZ y RBZ, se traduce en un incremento de su actividad farmacológica, siendo ésta especialmente importante frente a los estados parenterales del parásito. Esta mejora en la actividad antihelmíntica es atribuible a una mayor biodisponibilidad de los fármacos, por el efecto solubilizante y promotor de la absorción del Transcutol<sup>R</sup>.

### CUARTA.

La formulación en solución líquida convierte a un genérico de ABZ inactivo en un producto activo, con una eficacia antihelmíntica y comportamiento farmacocinético comparables al ABZ patrón, formulado de la misma manera. Este hecho refuerza la hipótesis de la existencia de formas cristalinas inactivas en el producto genérico al estado nativo.

### QUINTA

La preparación de soluciones líquidas, con agentes solubilizantes y promotores de la absorción, resulta por lo tanto, un recurso farmacotécnico muy útil, en el tratamiento de helmintosis tisulares, al incrementar notablemente la biodisponibilidad de los fármacos y eliminar la presencia de polimorfos inactivos.

**SEXTA.**

Cuando ABZ y RBZ se formulan como dispersiones sólidas en polivinilpirrolidona, su actividad antihelmíntica, en relación con los productos nativos, aumenta significativamente cuando se administra, a dosis bajas, frente al estado de preadultos. Frente a larvas emigrantes y enquistadas no se observaron incrementos relativos de eficacia .

**SEPTIMA.**

La coadministración de ABZ e inhibidores de oxidasas microsomales, determina cambios importantes en el perfil farmacocinético del ABZ, con un aumento significativo de los parámetros  $C_{max}$  y  $ABC_{0-48h}$ ; lo que se traduce en una mejora equivalente de su actividad farmacológica.

**OCTAVA.**

Frente a larvas emigrantes, la terapia única con ABZ, a la dosis de 50 mg/kg + metimazol<sup>R</sup> (MTZ) 3 mg/kg ó ABZ 100 mg/kg + metirapona<sup>R</sup> (MTP) 30 mg/kg, resulta mas eficaz que la administración de ABZ sólo, durante tres días consecutivos. Frente a larvas enquistadas, la administración de ABZ + MTZ ó MTP, durante tres días consecutivos, resulta mas eficaz.

**NOVENA.**

De los dos inhibidores utilizados, si bien con MTP se alcanzan actividades antihelmínticas mas altas, los incrementos relativos de eficacia resultan claramente superiores, cuando el inhibidor utilizado es el MTZ.

**DECIMA.**

En nuestros experimentos, el uso simultáneo de dos recursos farmacotécnicos, como es la administración de ABZ en solución líquida, a dosis de 25 mg/kg, junto con MTZ (1,5 mg/kg) ó MTP (20 mg/kg), no mejoró significativamente la actividad antihelmíntica de ABZ.

**DECIMOPRIMERA.**

Queremos destacar la idoneidad del modelo experimental utilizado, por permitir estudiar en individuos homólogos, de forma simultánea y con alta reproductibilidad, la actividad antiparasitaria de fármacos, en relación a sus características biofarmacéuticas y farmacocinéticas.

## **BIBLIOGRAFIA**



- ABIA-VEGA, P; BOLÁS FERNANDEZ, F; MARTINEZ FERNANDEZ, A.R; 1982. The antihelmintic action of albendazole upon *Trichinella pseudospiralis*. Revista Iberica de Parasitología, Spec. Vol.: 509-518.
- ABOUL-ATTA, N; DENHAN, D.A. 1978 The effect of 5-benzimidazo-2-(4-thiazolyl) benzimidazole on *Trichinella spiralis*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 (6): 671-672.
- ADAMS, E.J; STEPHENSON, L.S; LATHAN, M.C Y KINOTI, S.N. 1994. Physical activity and growth of Kenyan school children with hookworm, *T.trichura* and *A.lumbricoides* infection are improved after treatment with albendazole. J.Nutr. 124 (8): 1199-1206
- AHMAD, M.A; MIR, A.S; PANDIT B.A, KIRMANI, M.A. 1990. Albendazole in the treatment of gastrointestinal nematodes in sheep. Journal of Veterinary Parasitology. 4 (1)77-78.
- AI-ISSA, T; JAFAR, H.T; IDAN, H. 1985. A field study of the treatment of intestinal helminths by the drug Zentel. Bulletin of Endemic Diseases 26(1-4) 81-91.
- ALCAINO, H.A; GORMAN, T.R; ELORRIETA, M.B; 1984. A comparison between the efficacy of thiabendazole and febantel on experimental trichinellosis in rats. Veterinary Parasitology; 14 (2) 153-157.
- ALI, D.N; CHICK, B.F. 1992 Effect of feed type on the kinetic disposition of oxfendazole. Research in veterinary Science. 52: 382-383
- ALI, D.N; HENNESSY, D.R, 1993 The effect of feed intake on the rate of flow of digesta and the disposition and activity of oxfendazole in sheep. Int.J. Parasitol. 28/4 477-484.
- AL-KARAWI, M.A; YASAWY, M.I; MOHAMED, A.R.E. 1993 Combination of praziquantel and albendazole in the treatment of hydatid disease. (Correspondence) Saudi Medical Journal 13 (5) 468.
- ALZIEU, J.P; BITCHET, H; DORCHIES, P ; POTHIER, F. 1990. Results of four years of clinical trials with albendazole slow-release device in sheep. 2. Effects on fertility, lambing rate and productivity of ewes. Revue de Médecine Vétérinaire. 141 (3) 199-204.
- AMATO NETO, V; PINTO, P.L.S; MOREIRA, A.A.B; CAMPOS, R; SANT'ANA, E.J DE; LEVAL, E.V; PADHILHA, L.A.A; TAKIGUTI, C.K. 1986. Evaluation of the activity of albendazole in the therapy of rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 28 (3) 181-184
- AMATO NETO, V; MOREIRA, A.A.B; FERREIRA, G.M.P; NASCIMENTO, S.A.B DO; MATSUBARA, L Y COL. 1998. Evaluation of therapeutic activity of albendazole in experimental and human infection with *Himenolepis nana*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 32(3) 185-188.
- AMRI, H.S; FARGENTON, X; BENOIT; TOTIS, M; BATT, A. 1988. Inducing effects of albendazole on rat liver drug metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. Toxicol. Appl. Pharmacol. 92: 141-149.
- AURET, B.J; BOYD, D.R AND HENBEST: H:B 1968; Stereoselectivity in the oxidation of sulphoxides to sulphones in the presence of *Aspergillus niger* Journal of the Chemical Society (C) 2374-2376
- AVERKIN, E.A Y COL., 1975 Methyl 5(6)phenylsufinyl-2-benzimidazole carbamate, a new potent anthelmintic. Med Chem. 18, 1164-1166
- AWDZI, K; HERO, M; OPOKU, NO; BUTTNER, DW; COVENTRY, PA; PRIME, M.A; ORME, ML; EDWARDS, G. 1994. The chemotherapy of onchocerciasis XVII. A clinical evaluation of albendazole in patients with onchocerciasis; effects of food and pretreatment with ivermectin on drug response and

- pharmacokinetics. Trop. Med. Parasitol. 45 (3): 203-208.
- BAEDER 1974, C BHAR, H; CHRIST, O; DUWEL, D; KELLNER, H; KIRSCH. 1974. Fenbendazole: a new, highly effective anthelmintic. Experientia, 30, 753
- BACKWINKEL, K.P AND THEMANN, H. 1972. Elektronenmikroskopische untersuchungen über die pathomorphologie der Trichinellose. Beitr. Pathol. 146 259-271.
- BALTAR, P; SANTAMARÍA, M.T; LEIRO; QUINTERO, P Y COL., 1989. Estudio de la eficacia de Netobimin (Hapasil<sup>®</sup>) contra *Trichinella*. en ratones CD1. Rev. Iber. Parasit. 49 (2) 193-197.
- BARKER, A.C Y FOSTER, R.G; 1973 German patent 2246605.
- BARGER, I.A; STEEL, J.W; RODDEN, B.R; 1993 Effects of a controlled-release albendazole capsule on parasitism and production from grazing Merino ewes and lambs. Australian Veterinary Journal, 70 (2) 41-48
- BAUER, C; HAFNER, M. 1990a. Efficacy of two formulations of Netobimin against gastrointestinal helminths in sheep. Veterinary Record. 127 (25/26) 621-622.
- BAUER, C; 1990b Comparative efficacy of praziquantel, albendazole, febantel and oxfendazole against *Moniezia expansa*. Veterinary Record, 127 (14) 353-354
- BAUER, T.M; BRUHWILER J; ASCHWANDEN M; WAGNER, S; SCHWANDER, J 1994. Neurocysticercosis. Dtsch. Med. Wochenschr. 119 (6): 175-179.
- BELL, R.G; 1985. Genetics of adult *Trichinella spiralis* rejection during primary infection. In Trichinellosis (ICT 6) C.Kim (ed) State University of New York Press, Albany, p 77-83
- BELL, S.L; THOMAS, R.J 1992: The efficacy of an albendazole intraruminal controlled- release device against gastrointestinal parasitism in lambs. Veterinary Parasitology. 41 (3-4) 233-239.
- 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 (9) 1163-1165.
- Bekish, O; Ya, L; Burak, I.I; Kolosova, M.O; 1979 A search for active preparations in the carbamate benzimidazole group for the therapy of trichinellosis. Med. Par. I Paraz. Bolez. 48 (4); 32-35.
- Behm C.A and Bryant C; 1985. The modes of action of some modern anthelmintic. In Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs (Edited by Anderson y Waller P.J) pp 57-67; CSIRO Division of Animal Health, Glebe. NSW.
- BEUS, A. 1989. Comparative study of thiabendazole and mebendazole in strongyloidiasis. Lijec Vjesu 111: 98-101.
- BHOPALE, G.M; BHATNAGAR, B.S; 1988. Efficacy of various anthelmintics against third- stage larvae of *Ancylostoma caninum* in the brain of mice. Journal of Helminthology. 62 (1) 40-44.
- BOGAN, J.A; BENOIT, E & DELATOUR, P; 1987. Pharmacokinetics of oxfendazole in goats: a comparison with Sheep. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 10, 305-309.
- BOGAN, J.A Y MARRINER, S.E; 1980; Journal of Pharmaceutical Sciences. 69. 422-433
- BOLAS FERNANDEZ, F; MARTINEZ FERNANDEZ, A.R; SANTOS, M.C; 1981. Anthelmintic effect of

- oxfendazole, febantel and tioxidazol on the various stages of *Trichinella* spp. In Trichinellosis (Ed. C.W. Kim; E.J Ruitenber; J.S Teppema Reedbooks Ltd; Surrey, UK. pp: 331-335
- BORGERS M Y DE NOLLIN S, 1975a. Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment *in vivo* Journal of Parasitology, **60**: 110-112.
- BORGERS M Y DE NOLLIN S, VERHEYEN A, DE BRABANDER M Y THIENPONT D; 1975b Effects of new anthelmintics on the microtubular system of parasite. In Microtubules and Microtubule inhibitors (Edited by Borgers y De Brabander M) pp 497-508 North Holland/ Elsevier. Amsterdam.
- BORGSTEEDE, F.H.M Y REID, 1982. Oxfendazole efficacy in calves: a comparison of oral and intraruminal routes of administration. Vet. Parasit. **4** 139-141
- BORGSTEEDE, F.H.M; KLAASSEN, C.H.L. 1988. Prophylactic effect of a pulse release bolus containing albendazole on gastrointestinal helminth infections in calves. Tijdschrift voor Diergeneeskunde. **113** (12) 665-672.
- BOULOS, L.M; ABU SAMRA, L.M; AMIN, S.M; EL NASERY, S.F Y COL., 1987. Effect of albendazole on enteral and parenteral phases of *Trichinella spiralis*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, **17**(1), 341-346
- BOURÉE, P. 1992. Parasitoses Intestinales infantiles. Encyclopedie medico-chirurgicale. (Paris). 4015F<sup>10</sup>.
- BOTERO, D; TANOWITZ, H.B; WEISS, L.M; WITTNER, M. 1993. Taeniasis and cysticercosis. Infect. Dis. Clin. North. Am. **7**(3) 683-697.
- BURAK, I.I; 1980. The treatment of experimental trichinellosis with benzimidazole derivatives. In IX Konf. Ukrainskogo Parazitolo; Obshchestva. Tezisy dokladov. Cast. 1. Kiev, USSR; "Naukova Dumka". pp 102-103.
- BRUCE, R.G. 1974; The formation and utilization of schistosome secretory globules in *Trichinella spiralis*. In Trichinellosis (ICT 6) C.Kim (ed) Intext Educational Publishers, New York, p 43-48
- BRUTTO, O.H DEL; SOTELO, J; AGUIRRE, R; DIAZ-CALDERON, E; ALARCON, T.A. 1992. Albendazole therapy for giant subarachnoid cysticerci. Archives of Neurology. **49** (5) 535-538.
- BRÜTTO-DEL. O.H. 1994. Cysticercus granuloma (letter) Neurology. **44**(4): 777.
- CAI, X.P; 1986. Anthelmintic effect of albendazole on various day-old immature larvae of *Fasciola hepatica* in experimentally infected sheep. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology (Zhongguo Shoyi Keji) n<sup>o</sup>1, 21-25
- CAMPBELL, W.C ; 1967. Distribution of *Trichinella spiralis* in the small intestine of young mice. J. Parasitolo; **53**: 395-397.
- CAMPBELL, W.C.; REW R. 1986. Chemotherapy of parasitic diseases plenum press. New York, London. 655 pag.
- CAMPBELL, W.C. 1990. Benzimidazoles: veterinary uses. Parasitology Today. **6** (4) 130- 133.
- CAPO, V; D.D DESPOMMIER AND S. SILVERSTEIN. 1984. The site of ecdysis of the L1 larva of *Trichinella spiralis*. Journal of parasitology. **70** 992-994.

- CASTELLANO,G; MORENO-SANCHEZ,D; GUTIERREZ,D; GUTIERREZ,J; MORENO-GONZALEZ,E; Y COLABORADORES. 1994. Caustic sclerosing cholangitis. Report of four cases and cumulative review of the literature. Hepatogastroenterology, 41 (5): 458-470.
- CAUMES,E; GENTILINI,M; 1993. Treatment of cutaneous ancylostoma larva migrans. Ann.Dermatol. Venereol. 120 (8) 571-573.
- CLARKSON.M.J; MORRIS D.L; STALLBAUEMER M.F; PRITCHARD J.E; CHINNERY J.B; 1986. Albendazole treatment of pulmonary hydatid cysts in naturally infected sheep. In Proceeding of second International Symposium on taeniasis/cysticercosis and echinococcosis /hidatidosis 2-7 December 1985 (Edited by Prokopic,j; Sterba,J) České Budějovice, Czechoslovakia; Paracytology Ústav CSAV, 1986 pp 187-195
- CHANTHAVANICH,P; NOTASUT,P; PRARINYANUPARP,P; SA-NGUANKIAT,S; 1989. Repeated doses of albendazole against strongyloidiasis in Thai children. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 20(2) 221-226.
- CHEETHAM,R.F; MARKUS,M.B; 1991. Drug treatment of experimental *Capillaria hepatica* infection in mice. Parasitology Research. 77 (6) 517-520.
- CHIBA,Y; KOHRI,N; ISEKI,K; MIYAZAKI,K; 1991. Improvement of dissolution and bioavailability for mebendazole,an agent for human echinococcosis by preparing solid dispersion with polyethylene glycol. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 39 (8) 2158-2160.
- CHICK,B; RUNKEL,R AND PEARSON,I. 1987 Method of enhancing activity of benzimidazole anthelmintic. Proc. 12th conf W.A.A.V.P. Abstract. 11B-1 Montreal. Canada.
- CHIENS,F.L; FOON,K.L.P; HASSAN,K. 1989. Efficacy of albendazole against the three common soil-transmitted helminthiases. Tropical Biomedicine. 6(2) 133-136
- CHINNERY,J.B; MORRIS.D.L. 1986. Effect of albendazole sulphoxide on viability of hidatid protoscolices "in vitro". Trans B. Soc. Trop. Med. Hyg. 80: 815-817.
- CHUNG WC; FAN, P.C; LIN,C.Y; WU, C.C. 1991. Poor efficacy of albendazole for treatment of Human Taeniasis. Inter. J. For Parasit. 21 (2) pp 269-270.
- CRIADO FORNELIO F, RODRIGUEZ CAABEIRO Y JIMENEZ GONZALEZ, 1987. The mode of action of some benzimidazole drugs on *T.spiralis* Parasitology; 95:(1) 61-70.
- COLAUD,J.P; ROSSIGNOL; 1984. Albendazole:a new single dose anthelmintic, study in 1455 patients. Acta Trop (Basel) 41:87
- COOK, .L; TORNER, J.J AND FELLOWS, E.S. 1954a. Journal Pharmacology Exptl Therap. 111; 131
- COOK, L; NAVIS,G AND FELLOWS, E.S. 1954b. ibid.112; 473.
- COOK, G.C, 1989.Crr. Opinion. Gastroente. 5. 126-139.
- COOK, G.C. 1990. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiases: indications and efficacy. Parasitology Today. 6 (4) 133-136.
- CORBA,J; KRUPICER,I; LEGENY, J; STOFFA,P; ANDRASKO,H; 1988. Aldifal(albendazole) a new broad-spectrum anthelmintic for ruminants. Veterinárstvf. 38 (3) 121-122.

- CORBA,J; KRUPICER,I; LEGENY, J; JURIS,P; VESELY,L. 1991. Effect of a controlled-release albendazole capsule on parasitism and productivity of sheep. Veterinary Parasitology. 40 (3-4) 273-279
- CORBA,J; LEGENY,J; VESELY, L; 1992. Comparison of the efficacy of two albendazole preparations on the course of helminthosis and sheep production. Veterinárství 42 (9) 334-335.
- CORBA,J; KRUPICER,I; VARANDY,M; PET'KO,B; 1994 Effect of bolus administration of albendazole into the rumen on gastrointestinal nematodes and the *D.dendriticum* nematode in sheep. 3986) 297-304
- COTTING,J; ZEUGIN,T; STEIGER,V AND REICHEN,J. 1990. Albendazole kinetic in patients with echinococcosis. Delayed absorption and impaired elimination in cholestasis. Eur. J. Clin. Pharmacol. 38: 605-608.
- CURRY,A; CANNING E.V. 1993 Human microsporidiosis. J. Infect 27 (3) 229-236.
- DELATOUR,P; CURE,M.C; BENOIT,E; GARNIER,F; 1986, Netobimin: preliminary investigations on metabolism and pharmacology. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 9, 230-234
- DELATOUR, P ; BESSE,S AND ROMDANE,M; 1988. Pharmacocinétique et activité microcoeliciae du thiophanate et son métabolite majeur chez les ruminants. Ann.Rech.Vet. 19:119-122
- DELATOUR,P Y COL.;1988b. Metabolism, mode of action and pharmacokinetics of anthelmintics for ruminants. Revue Méd Vét. 139,( 1), 47-52
- DELATOUR,P; BENOIT,E; LECHENET,J AND BESSE,S; 1990, Pharmacokinetics in sheep and cattle of albendazoles administered by intraruminal slow release capsule. Research in Veterinary Science, 48; 271-275.
- DELATOUR,P; BENOIT,E; CAUDE,M & TAMBUTE,A .1990a. Species differences in the generation of de chiral sulfoxide metabolite of albendazole in sheep and rats. Chirality.2, 156-160.
- DELATOUR,P; BENOIT,E; GARNIER,F AND BESSE.S 1990b, Chirality of the sulfoxide metabolites of fenbendazole and albendazole in Sheep. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 13,361-366.
- DELATOUR,P; BENOIT,E; BESSE.S AND BOUKRAA.A; 1991b Comparative enantioselectivity in the sulfoxidation of albendazole in ma,dogs,rats. Xenobiótica 21, 2, 217-221
- DELATOUR,P; F. GARNIER; BENOIT.E; CAUDE,I; 1991, Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulfoxide in sheep, goats and cattle. Research in Veterinary Science, 50, 134-138.
- DELGADO, O; BOTTO,C; MATTEI,R; ESCALANTE,A; 1989. Effect of albendazole in experimental toxocariasis of mice. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 83 (6) 621-624.
- DEL-ESTAL, J.L; ALVAREZ, A.I; VILLAVARDE, C Y COL; 1991. Effect of surfactants on albendazole absorption. J. Pharm and Biomedical Analysis, 9 (10-12) 1161-1164.
- DEL-ESTAL, J.L; ALVAREZ, A.I; VILLAVARDE, C Y COL; 1993. Comparative effects of anionic, natural bile acid surfactants and mixed micelles on the intestinal absorption of anthelmintic albendazole J. Pharm. 91 (2-3) 105-109.
- DEL-ESTAL,J.L; ALVAREZ.AI; VILLAVARDE,C; JUSTEL,A; PRIETO,JG. 1994. Increased systemic bioavailability of albendazole when administered with surfactants in rats. Int.J.Pharm. 102 1-3: 257-260
- DENHAM,D.A; MARTINEZ,A.R; 1970. Studies with methyridine and *Trichinella spiralis*. 2. The use of

- the drug to study the rate of larval production in mice. J. Helminthol. 44: 357-363.
- DESPOMMIER D.D; 1973. A circular Thermal Migration device for the rapid collection of large numbers of intestinal helminths. Journal of Parasitology 59: (5) 933-935.
- DESPOMMIER D.D; 1975. Adaptive changes in muscle fibers infected with *Trichinella spiralis*. American Journal of Parasitology 74: 477-496.
- DESPOMMIER D.D. 1983. Biology. In Trichinella and Trichinosis. W.C Campell (Ed.) Plenum Press, New York, p: 75-142
- DESPOMMIER D.D; 1993. *Trichinella spiralis*. and the concep of niche. Journal of Parasitology 79:(4) 472-482.
- DIETERICH, D. T; LEW, E.A; KOTLER D.P Y COL. 1994. Treatment with albendazole for intestinal disease due *Enterocytozoon bienuesi* in patients with AIDS J. Infect Dis. 169 (1), 178-183
- DICK, E.C; GREENBERG, S.M; HERNDON, J.F; JONES M AND COL., 1960. J. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 104. 523.
- DICK, B; GÜLBAHÇE, S; 1988 Efficacy of albendazole against gastrointestinal nematodes. *Dictyocaulus filaria* and *Moniezia* spp in sheep. Veteriner Fakültes Dergisi. Selçuk Universitesi 4 (1) 309-315
- DLUGIEWCZ-BULLA, M; SENIUTA, R; PIOTROWSKI, R; GRZYWSKI, L; 1981. Efficacy of Noviden and Panacur on the muscle phase of *Trichinella* in mice. Wiad. Parazytol. 27 (3): 521-525
- DORCHIES, P; LAHITTE, J.D.DE; ALZIEU, J.P; POTHIER, F; 1989. Treatment and prevention of helminthoses on sheep by an intrareticular slow-release device containing albendazole. Revue de Médecine Vétérinaire. 138 (2) 101-108.
- DORCHIES, PH, 1990. Les progrès de la chimiothérapie antiparasitaire a la lumière D'ICOPA VII. Conférence prononcée lors du Symposium de Parasitologie ARKOVET, CIBA-GEIGY, 2-3 octobre 1990.
- DORCHIES, PH; POTHIER, F; NAVETET, H; BAROUX, D; CHARRIER, L; 1992 intérêt du traitement fasciolicide des vaches charolaises par l'albendazole le jour de la rentrée a l'étable. Rev. Med. Vet. 143 8-9, 677-680
- DOUCH, P.G.C. AND BUCHANAN, L.L; 1979. Some properties of the sulfoxidases and sulfoxide reductaes of cestode *Moniezia expansa*, the nematode *A. summ* and mouse liver. Xenobiotica. 9 :675-679.
- DUWEL, D; 1981. Trichinellosis: successful treatment with fenbendazole. In Trichinellosis (Ed. C.W. Kim; E.J Ruitenber; J.S Teppema Reedbooks Ltd; Surrey, UK. pp: 299-303.
- EBEID, F.A; METWALLY, A,A; BOTROS, S,S; BENETT, J.L. 1994 Treatment of experimental schistosomiasis mansoni with praziquantel alone and combined with cimetidine. Arzneimittel Forschung 44-2. 1268-1270.
- EDWARDS, G; BRECKENRIDGE, A. 1988. Clinical pharmacokinetic of antihelminthic drugs. Clin. Pharmacokinet , 15, 67-93
- EICHLER, D.A 1973. Br Vet. Journal. 129, 533-543.
- ELLIS, M; SINNER, W.VON; AL-HOKAIL, A; SIECK, J. 1992, A clinical-radiological evaluation of

- benzimidazoles in the management of *Echinococcus granulosus* cysts. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 24 (1) 1-13
- ESCOBEDO,F; PENAGOS,P; RODRIGEZ,J AND SOTELO. 1987. Albendazole therapy for neurocysticercosis. Arch. Intern Med. 147, 738-741
- FARGETTON, X; P.GALTIER AND P.DELATOUR;1986. Sulfoxidation of albendazole by cytochrome p450-independent monooxygenase from rat liver microsomes, Veterinary Research Communicatios,10: 314-324.
- FAN,P.C; CHUNG,W.C; CHANG,C.H; CHEN,Y.A; CHENG F.Y AND HSU. 1986. Studies on taeniasis in Taiwan. V Field trial on evaluation of therapeutic efficacy of mebendazole and praziquantel against taeniasis. Southeast Asian Journal of Tropical Med. and Pblc Health. 17: 82-90.
- FERNANDO,S.SE Y DENHAM, D.A. 1976. The effects of mebendazole and fenbendazole against *T.spiralis* in mice. J.Parasitol. 62. 874-876
- FETTERER, R.H AND REW R.S; 1984. Interaction of *F.hepatica* with albendazole and its metabolites. Journal of veterinary pharmac. and Therap. 7, 113-118.
- FOREYT,W.J; 1988; Efficacy and safety of albendazole against experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in goats. Veterinary Parasitology, 26 (3-4) 261-264.
- FOURESTIE, V; BOUGNOUX,M; ANCELLE, T; LIANCE, M; ROUDOUT-THOURAVER,F; NAGA,H; PAIRON\_ PEUNACHIONI,M; RAUSS, A;LEJONC J. 1988. Randomized trial of albendazole versus tiabendazole plus flubendazole during an outbreak of human Trichinellosis. Parasitol Res. 75 : 36-41
- FOUTS, JR Y BRODIE, B.B; 1955. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 115,68
- GALTIER,P; ALVINERIE, M; PLUSQUELLEC, Y; TUFENKJI,A,E; HOUIN,G. 1991. Decrease in albendazole sulphonation during experimental fascioliasis in sheep. Xenobiotica 21 (7) 917-924
- GALTIER,P. 1991a. Metabolisme des benzimidazoles et activité inductrice enzymatique. Revue. Med. Vet. 142, 8-9, 633-636.
- GALTIER,P; ALVINERIE,M;STEIMER,J; FRANTECHEAU,P; PLUAQUEVEC,Y; HOUIN,G; 1991. Simultaneous pharmacokinetic modeling of a drug and two metabolites; Application to albendazole in sheep. journal of Pharmaceutical Sciences, 80, 3-10.
- GALTIER,P; ALVINERIE,M AND DELATOUR,P; 1986, In vitro sulfoxidation of albendazoles by ovine liver microsomes: Assay and frequency of various xenobiotics. American journal of Vetrerinary Research, 46, 447-450.
- GALAL,M; CHIN,S.R. 1987. Comparative activity anthelmintic drug, mebendazole, praziquantel and albendazole against *Hymenolepis dlmnuta* in experimentally infected rats. Revue d 'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 40 (2) 147-150.
- GATES, N.L; FOREYT, W.J. 1990. Use of albendazole for parasite control in sheep. Sheep Research Journal; 6 (2) 21-23.
- JARDINER,C.H; 1976. Habitat and reproductive behaviour of *Trichinella spiralis*. J.Parasitology 62 (6), 865-870.
- JAZDER,A.J; ROY,J. 1987. Albendazole suspension in the treatment of intestinal helminthiasis in children

Current Therapeutic Research, 41(3) 324-327

- GENCHI,C; TRALDI,G; BOSSI,P; VALLA,G. 1986a. Ovicidal activity of albendazole in natural gastrointestinal strongyle infections of cattle. Atti della Società Italiana di Buiatria, 18, 48-487
- GENCHI,C; TRALDI,G; BOSSI,P; VALLA,G. 1986b. Ovicidal activity of albendazole in natural gastrointestinal strongyle infections of cattle. Obiettivi e Documenti Veterinari, 7 (10) 49-51
- GIL-GRANDE, L.A; RODRIGUEZ-CAABEIRO,F; PRIETO,J.G; SANCHEZ-RUANO,J.J; BRASA,C; AGUILAR,L, GARCIA-HOZ,F1993.Randomised controlled trial of efficacy of albendazole in intr-abdominal hydatid disease. Lancet, 342 (8882) 1269-72.
- GLEIZES C; EECKOUTTE,C; PINEAU,T; ALVINERIE,M; GALTIER P.1991. Inducing effect of oxfendazole on cytochrome P450IA2 in rabbit liver. Consequences on cytochrome P450 dependent monooxygenases. Biochem.Pharmacol, 41 (12): 1813-1820.
- GLEIZES C; LARRIEU,C; EECKOUTTE,C; PINEAU,T; GALTIER P.1991a. Comparative inductibility of cytochrome P450 by oxfendazole and fenbendazole: use primary cultures of rabbit hepatocytes Acta Vet. Scand., Suppl., 87: 230-232.
- GLEIZES C; LARRIEU,C; EECKOUTTE,C; PINEAU,T; GALTIER P.1991b. Acta Vet. Scand., Suppl., 87: 445.
- GHARIZANOVA,T; TORLAKOV,I; ZHELYASKOV,N; TODOROVA,N; SHEIKOV, N. 1972; Antinematodic activity of 2-substituted benzimidazoles. In Adv. in Antim. and Antineop. Chemother. (Ed. M. Hejzlar; M. Semonsky; S.Masak) Univ. Park. Press, Baltimore. pp: 449-451.
- GOLEMATIS,B; LAKIOTIS,G; PERSIDOU-GOLEMATI,P; BONATSOS,G. 1989. Albendazole in the conservative management of multiple hydatid disease. Mount Sinai Journal of Medicine 56(1) 53-55
- GÓMEZ BARRIO,A. 1985.Suceptibilidad a antihelmínticos de *T.pseudospiralis* GARKAVI, 1972 y utilidad de *Trichinella* spp. para el cribado *In vitro*. Tesis Doctoral.
- GOTTSCHALL,D.W; THEODORIDES,V.J Y WANG,R.1990. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. Parasitology Today,4. 115-124.
- GOTTMANN,S,H; R. KROKER AND F.R UNGEMACH. 1991.Investigations on the biotransformation of mebendazole using on isolated perfused rat gut system. Xenobiotica, vol 21, nº 11, 1431-1439.
- GOULD,S.E. 1970 In Trichinellosis in man and animals. S.E Gould (ed) Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Illinois, p 147-189.
- GOLDSMITH. R.S; 1998; Recent advances in the treatment of helminthic infections: ivermectin, albendazole, and praziquantel. Parasitic infections; vol 7; 327-347
- GROVE,D.I; LUMSDEN,J; NORTHERN,C; 1988. Efficacy of albendazole against *Strongyloides ratti*, *S.stercoralis* in vitro, in mice, and in normal and immunosuppressed dogs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 21,75-78
- GRZYWINSKI AND KAMANSKA, K. 1989. Efficacy of luxabendazole against different stages of *Trichinella spiralis*. In *Trichinellosis* 7
- GUHA,C; ROY,S; BANERJEE,A.K; 1986. Efficacy of albendazole (analgon) in the treatment of

- gastrointestinal nematodes in goats in West Bengal. Indian Veterinary Journal; 63 (12) 1042-1044.
- GUHA, C; BANERJEE, A. K; 1987. Efficacy of four anthelmintics in the treatment of gastrointestinal nematodes of goats- a comparative assessment. Indian Veterinary Journal; 4 (4) 335-337
- GUNDLACH, J. L; UCHACZ, S; SADZIKOWSKI, A; TAMCZUK, K; 1991. Albendazole and luxabendazole, broad spectrum benzimidazole derivatives for treatment of helminthoses in ruminants. Medycyna Weterynaryjna. 47 (8) 364-365.
- GUTIERREZ-PALOMINO, P; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S; MARTINEZ-GOMEZ, F & ACOSTA-GARCIA, I; 1988; Muscular phase of *T. spiralis* treated with oxfendazole. Proceeding of the Seventh International Conference on Trichinellosis (Spain) 490-493.
- GYURIK, R. J; CHOW, A. W; ZABER, B; BRUNER, E. L; MILLER, J. A; VILLANI, A. J; PETKA, L. A. AND PARISH, R. C; 1981. metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats, and mice. Drug Met. Disp; 9:503-508.
- HALL, A; NAHAR, Q; 1994. Albendazole and infections with *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris* in children in Bangladesh. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88 (1) 110-112
- HALL, A; ANWAR, K. S. 1991. Albendazole infections with *Trichuris trichura*, *Giardia intestinalis*. southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 22(1) 84-87
- HAJJAR, N. P AND HODGSON, E; 1980. Flavine adenine dinucleotide dependent monooxygenase: its role in the sulfoxidation of pesticides in mammals, Science 209:1134-1136.
- HARLEY, J. P AND GALLICHICO, V; 1971. *Trichinella spiralis*: Migration of larvae in the rat. Experientia Parasitology; 30: 11-12.
- HAQUE, A; HOLLISTER, W. S; WILLCOX, A; CANNIG, E. U. 1993. The antimicrosporidial activity of albendazole. J. Invertebr. Pathol. 62 (2) 171-177.
- HE, W; NIU, B. H; DOU, L. Q; ZHANG, L; SUN, X. Q; 1986. Efficacy of some chemicals (albendazole etc.) against larvae of *Trichinella spiralis* and their toxicity in artificially infected rats. Chinese J. of Veterinary. Scien. and Technology. n°1, 16-21.
- HENESSY, D. R; LACEY, E; PRICHARD, R. K; STEEL, J. V. 1985. Potentiation of the anthelmintic activity of oxfendazole by parbendazole. J of Vet. Pharm. ad Therap. 10. 64-72.
- HENESSY, D. R; LACEY, E; STEEL, J. W Y PRICHARD, R. K; 1987. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. J of Vet. Pharm. ad Therap. 10, 64-72
- HENESSY, D. R; STEEL, J. W; LACEY, E; EAGLESON, G. K Y PRICHARD, R. K; 1989 The disposition of albendazole in sheep. J of Vet. Pharm. ad Therap. 12: 421-429.
- HOLENWEGER, J. A; WASERMAN, A; PEREZ, R. A; MATO, B; 1987; Anthelmintic efficacy of albendazole in dog. Veterinaria Argentina; 4 (32) 165-167.
- HOLENWEGER, J. A; PEREZ, R. A; MATO, B; 1988; Albendazole with praziquantel: anthelmintic efficacy in dog. Veterinaria Argentina; 5 (43) 246, 248-250.
- HOLMES, W. L; BENTZ, J. D; 1960. J. Biol. Chem. 238. 3118.

- HOMEIDA,M; LEAHY,W; COPELAND,S; ALI,MM; HARRON,DW. 1994 Pharmacokinetic interaction between praziquantel and albendazole in Sudanese men. Ann. Trop. Med. Parasitol. 88 (5): 551-9.
- HORTON, R.J; 1989. Chemotherapy of *Echinococcus* infection in man with albendazole. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 83 (1) 97-102.
- HRCKOVA,G; VELEBNY.S AND HORAK.J; 1993. A morphological study of effects of liposomized albendazole on the muscle phase of *T.spiralis*. in mice. Journal of Helminthology 67, 24-30.
- HRCKOVA,G; VELEBNY.S. 1994. Studies on the effects of free and liposomised albendazole on infections o *Mesocestoides corti tetrahyridia* (cestoda: Cyclophyllidea) in laboratory mice. Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 107/1 (71-77)
- HWANG,K.P ; CHEN,E.R. 1988. Larvicidal effect of albendazole against *Angiostrongylus Antonensis* in mice. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 39 (2) 191-195.
- JIANG,J.S; LIU,B.Y; CHEN,G; HAN,Q. 1988. The deworming effect of albendazole, thiabendazole, mebendazole and levamisole on *Strongyloides papillosus*. Chinese Journal of Veterinary Medicine. 14 (11) 2-4
- JIMENÉZ-GONZALEZ A, DE ARMAS-SERRA C, CRIADO FORNELIO A, CASADO-ESCRIBANO N, RODRIGUEZ-CAABEIRO F Y DIEZ J.C; 1991. Preliminary characterization and interaction of tubulin from *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivatives. Veterinary Parasitology. 39: 89-99.
- JURIS,P; CORBA,J; VENGLOVSKÝ,J; 1990. Vermitan premix 10% (bioveta,Nitra) a new albendazole preparation for treating intestinal helminthoses in pigs. Veterinářství. 40 (10) 454-456.
- JUNG,H; HURTADO,M; SANCHEZ, M;MEDINA,M.T; SOTELO,J; 1992: Clinical Pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. Journal of clinical Pharmacology. 32 (1) 28-31
- JUSTEL,A; ALVAREZ, AJ; ALONSO,ML; ESTAL-DEL JL; VILLAVERDE;C; BARRIO,JP; PRIETO,J.G. 1994. Influence of ethanol on gastric absorption and metabolism of albendazole and mebendazole. Drug Alcohol. Dep 36(1) 49-55.
- KAHL,G.N AND NETTER,K.J; 1970. The effects of metyrapone on cellular respiration and microsomal drug oxidation. Biochem. Pharmacology; 19. 27-34.
- KAMINSKY,R.G.DE. 1991. Albendazole treatment in human taeniasis. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.85 (5) 648-650.
- KARUNAKARAN, C.S; DENHAM,D.A. 1890 A comparasion of anthelmintic effect of oxfendazole and oxibendazole on *Trichinella spiralis* in mice. Journal Parasitology. 66: 929-932.
- KATO,R; VASSANELLI,P; CHIESARA,E. 1962. Experientia 18. 453.
- KEDDERIS.G AND RICKERT.D; 1985; Loss of rats microsomal cytochrome P450 during methimazole metabolism: role of flavin-containing mono-oxygenase. Drug Metabolism and Disposition. 13; 58-61.
- KEITTIVUTY A. AND KEITTIVUTY B. 1989 Anthelmintic effects of albendazole, mebendazole and diethylcarbamicine on *T.spiralis* in mice. J.Sci. Soc. Thailand. 15: 49-54
- KERBOEUF,D; HUBERT,J. 1990. Comparative efficacy of three families of anthelmintics against strongyles resistant to benzimidazoles. Recueil de Médecine Vétérinaire. 166 (8-9) 771-775.

- KHOLER Y BACHMANN 1981. Intestinal tubulin as possible target for chemotherapeutic action of mebendazole in parasitic nematodes. Molecular and Biochemical Parasitology 4: 325-336
- KOLOSOVA, M.O; OZERETSKOSKAJA, N.N; PEREVERZEVA, E.V. 1976. A new class of active trichinellicides. In Mat. dokl. Iloi vsesoy. Konf. po. probl. trikhinelleza. cheloveka i zivotnykh. (17-18 Maya.)
- KOLLARISTSCH H. JESCHKO. E AND WIEDERMAN. 1993. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87 (6) 49-54
- KULIEVA, N.S; BAYANDINA, D.G. 1988. Anti-cestode activity of preparations from carbamate benzimidazole group. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni. N° 3 pp 88-89
- KWAN, L.C; GYURIK R.J; CHIMES N; RITCH G.M; Theodorides V.J; 1988 Influence of dosing regimens on the antihelmintic activity of albendazole in sheep. Journal of Controlled Release. pp 33-38
- LATIF-LA Y SURIN, J. 1993. Relationsphis between the anthelmintic activity of eight derivares of benzimidazole carbamates against *T.spiralis*. and their chemical structures. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 46 (5-6): 203-214.
- LACEY, E. 1988; The role of the cytoskeletal protein, tubulin. In the mode of action and mechanis of drug resistance to benzimidazoles. Int Journal for Parasitology, vol 18, n° 7, pp 805-893.
- LACEY, E. 1990. Modo de action of benzimidazoles. Parasitology Today 6, 112-115.
- LANGE, H; EGGERS, R; BIRCHER, J. 1988. Increased systemic availability of albendazole when taken with a fatty meal. Eur. J. Clin. Pharmacol. 34: 315-317.
- LANUSSE, C.E; RANJAN, S & PRICHARD, R.K. 1990. Comparison of Pharmacokinetic variables for two injectable formulations of netobimin administered to calves. Americam Journal of Veterinary Research. 51 (9) 1459-1463
- LANUSSE, C.E; TRUDEAU, C; RANJAN, S & PRICHARD, R.D; 1991. Pharmacokinetic 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; NARE, B; GASCON, H & PRICHARD, R.D; 1992. Metabolism of albendazole sulphoxide by ruminal and intestinal fluids of sheep and cattle. Xenobiotica, 4, 419-426.
- LANUSSE, C.E; GASCON, H & PRICHARD, R.D; 1992c. Methimazole-mediated modulation of netobimin biotransformation in sheep: a pharmacokinetics assessment. J. Vet. Pharmacol. Therap; 15; 267-274
- LANUSSE, C.E & PRICHARD, R.D; 1992b. Effects of methimazole on the kinetics of netobimin metabolites in cattle. Xenobiotica. 22. 115-123.
- LANUSSE, C.E & PRICHARD, R.D; 1992a. Methimazole increase the plasma concentration of the albendazole metabolites of netobimin in sheep. Biopharmaceutics and Drug Disposition, 13, 95-103.
- LANUSSE, C.E; NARE, B & PRICHARD, R.K; 1993. Comparative sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes and the inhibitory effect of methimazole. Xenobiotica vol. 23.3. 285-295.
- LANUSSE, C.E & PRICHARD, R.D; 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. Veterinary Parasitology, 49: 123-158

- LANUSSE, C.E & PRICHARD, R.D; 1993a. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. Drug metabolism - Reviews, 25 (3) 235-279
- LANUSSE, C.E; GASCON, H & PRICHARD, R.D; 1995. Influence of the antithyroid compound methimazole in the plasma disposition of fenbendazole and oxfendazole in sheep. Research in Veterinary Science, 58 (3) 222-226.
- LIGHT, D.R; WAXMAN, D.J WALSH, C. 1982. Studies on chirality sulfoxidations monooxygenasa and hog liver FAD-containing monooxygenase. Biochemistry 21: 2490-2498
- LIU Y.H; WANG, X.G; CHEN, Y.T; YAO Y.Q. 1993. Computer tomography of liver in alveolar echinococcosis treated with albendazole. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87 (3): 319-321.
- LOTZE, R. 1989. Investigations on the efficacy of an albendazole controlled release bolus against trichostrongyle infections in first year grazing calves. Inaugural-Dissertation, Tierrärztliche Hochschule Hannover, Hannover. 115 pp.
- LOUW, J.P; REINECKE, R.K. 1993. Overberg research projects. XV. The efficacy of different anthelmintics against field strain of nematode parasites of sheep in southern Cape province. Journal of South African Veterinary Association, 64 (2) 71-75
- LUBEGA, G AND PRICHARD, R, 1991. Interaction of benzimidazole anthelmintics with H.contortus tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. Experimental Parasitology 73, 203-213.
- LUR^E, A.A; DZHABAROVA, V.I; KROTOV, A.I; SHCHERBAROV, A.M. 1986. The effect of phospholipids on the pharmacodynamics of mebendazole in experimental multilocular hydatidosis. Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni, N° 5, 67-71.
- MADHAV, A.B; MAGESH, M; VENKATRAMAN, R; GNANAPRASAM V. 1989. Efficacy of albendazole in mixed helminthic infection in equines. Centaur (Mylapore), 6 (2) 53-54
- MAGE, C; POTHIER, F. 1990. Administration of the albendazole slow-release device (Proftril) in sheep three weeks before autumn mating and effects on fertility. Revue de Médecine Vétérinaire, 141 (11) 851-854.
- MAKI, J; YARAGISAMA, T; 1983. A comparison of the effects of flubendazole and thiabendazole on the larvae of Angiostrongylus cantonensis, T.spiralis, Diphyllobothrium erinacei and H.nana in mice. Paratitology, 87(3) 525-531
- MALKIN M.F Y CAMACHO, R.M . 1972. The effect of thiabendazole on fumarate reductase from thiabendazole-sensitive and resistant Haemonchus contortus. J.Parasitol 58. 845-846
- MARRINER, S.E; MORRIS, D.L; DICKSON B; BOGAN, J.A. 1986 Pharmacokinetics of albendazole in man. Europ. J. Clin. Pharmacol. 30. 705-708.
- MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R; 1978. Algunos efectos de los corticoesteroides sobre el ciclo endógeno de Trichinella spiralis. Trab. Comp. Biol; 7: 181-219.
- MARTINEZ FERNANDEZ, A.R; BOLAS FERNANDEZ, F; GARATE ORMAECHEA, T 1982. The influence of adoptive immunity on the action of mebendazole against encysted larvae of Trichinella spiralis. Rev. Iber. Parasitol; Spec Vol 389-396.
- MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R; 1979. Tratamiento de la triquinosis experimental. Efecto límite del Mebendazol contra larvas enquistadas. Rev. Iber. Parasitol; 39 (1-4): 305-312.

- MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R; MARTINEZ-GRUEIRO, M.M; ALBARRAN GÓMEZ, E. CADORNIGA CARRO, R; FERNANDEZ SÁNCHEZ, C. 1990. Actividad antihelmíntica de una nueva formulación de mebendazol. Revista Iberica de Parasitología, **50**: 353-358
- MANUEL, M.F; NAVEA, R.P; 1989. Efficacy of albendazole against ascarids and hookworms in puppies. Philippine Journal of Veterinary Medicine, **26** (1) 41-43.
- MACKELLAR, Q.A AND SCOTT, E.W; 1990. The benzimidazole anthelmintic agents - review; Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics, **13**, 223-247.
- McCRACKEN R.O; 1978. Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. J. Parasitol. **64** (2): 214-219.
- McCRACKEN R.O ; GARCÍA A AND ROBINS, M.B. 1982. Mebendazol therapy of enteral trichinellosis. J. Parasitol. **68**(2) 259-262
- McCRACKEN; NERSTE, D.H; HOSS, J AND GARCIA. 1984. Oxfendazol regimen dependent expression of drug efficacy against *T.spiralis* Int. J. Parasitol. **14**, 277-281
- McCRACKEN R.O. 1989 Experimental and theoretical studies of antihelmintic oxfendazole and imidazo [1,2-alpha] pyridine-2-carbamate isomer. I. Journal. for Parasito. **19**, 363-368.
- McCRACKEN R.O; LIPKOWITZ, K.B; 1990. Structure activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics. a molecular modeling approach to *in vivo* drug efficacy. J. Parasitol. **853-864**.
- McCRACKEN R.O; LIPKOWITZ, K.B; 1990a. Experimental and Theoretical studies of albendazole, oxibendazole and tioxidazole. Journal of Parasitology. **76**(2) 180-185.
- McCRACKEN R.O, AND W.H. STILLWELL. 1991 . A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics. International Journal for Parasitology. vol **21**, (1): 99-104.
- McCRACKEN R.O; LIPKOWITZ, K.B; DRENEN, N.O; 1992. Efficacy of albendazole and mebendazole against *Hymenolepis microstoma* and *Hymenolepis diminuta*. Parasitology Research. **78** (2) 108-111.
- MEDINA, M.T; GENTON, P; MONTOYA, M.C; CORDOVA S; Y COL.. 1993. Efect of anticysticercal treatment on the prognosis of epilepsy in neurocysticercosis: a pilot trial. **34** (6): 1024-1037.
- MERCK INDEX, 19 ed. Merck & Co., Inc. Rahway N.Y. USA. 1989.
- MILLER, E.J. HEMBRY, F.G; KEARNEY. 1988 Efficacy of oxfendazole against inhibited larvae of *O. Ostertagi*. acquired by calves in spring. Am J. Vet. Res. **49**: 1007-9
- MISRA, S.C; SWAIN, G; DASH, B; MOHAPATRA, N.B.D; 1989. Flukicidal activity of Valbazen (SK&F) against naturally acquired fasciolosis in cattle buffaloes and goat. Indian Veterinary Journal. **66**(9) 858-860
- MISRA, S.C; SWAIN, G; DASH, B; MOHAPATRA, N.B.D; 1989b. Flukicidal activity of Valbazen (SK&F) against naturally acquired *Moniezia* infection in calves and Kids. Indian Veterinary Journal. **66** (6) 559-561
- MOJON, M; SAURA, C; ROOJEE, N; SUNG, R.T.M. 1987. Albendazole and thiabendazole in murine strongyloidiasis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **19** (1) 79-85

- MORRIS D.L; TAYLOR, D.H; 1990. *Echinococcus granulossus*: development of resistance to albendazole in an animal model. Journal of Helminthology. **64** (2) 171-174
- MOSKOPP, D; LOTTERER, E: 1993. Concentrations of albendazole in serum, cerebrospinal fluid and hydatidous in cyst. Neurosurg. Rev. **16/1** 35-37
- MUKERJEE A; ROY T; MUKERJEE S; BASU, N; DUTTAMUNSH, A. 1993. Neurocysticercosis. J. Assoc. Physicians. India. **41** (5) 287-289
- MURRAY, M; ALISON, M; YASSA, V; 1992. Hepatic microsomal metabolism of the anthelmintic benzimidazole fenbendazole: Enhanced inhibition of cytochrome P450 reactions by oxidized metabolites of the drug. Chem. Res. Toxicol. **5**, (1) 60-66.
- NIPHADKAR S.M; NARSAPUR V.S; DESHPANDE V.S; HEHETE, R.S; RANADE V.V, 1986. Field trials of albendazole against gastro-intestinal nematodes of sheep. Indian Veterinary Journal; **63** (8) 675-677
- NEW, R.R.C; WEN, H; CRAIG, P.S; ZOU, P.F; MERDAN, A; WANG, Y.H Y COL.. 1994. Efficacy of albendazole administered orally is improved by encapsulation liposomes. J. Control. Release. **28/1-3** :350-351.
- NONTASUT, P; SINGHASIVANON, V; PRARINYANUPARP, V; CHIAMRATANA, B AND COL.. 1989. Effect of single dose albendazole and single dose mebendazole on *Necator americanus*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. **20(2)** 237-242.
- OZERETSKOVSKAJA, N.N; CHERNYAEVA, A.I; KOLOSOVA, M.D; Y COL. 1971. Search for the specific therapy for Trichinellosis in white mice. V. Cholo phenil derivatives of benzimidazoles in experimental trichinellosis in white mice. Med. Par. i Paraz. Bolez. **40**: 411-414.
- PAMBA, H.O. 1987. Open study in the treatment of *T. trichura* and *T. saginata* with 800 mg albendazole as single dose. East. Afri. Med. J. **64(9)**, 590-594.
- PAMBA, H.O; BWIBO, N.O; CHUNGE, C.N; ESTAMBALE, B.B.A. 1989. A study of efficacy and safety of albendazole (Zentel) in the treatment of intestinal helminthiasis in Kenya children less than 2 years of age. East African Medical Journal. **66(3)** 197-202
- PEREVERZEVA, E.V; VERETEINIKOVA N.L; OZERETSKOVSKAJC. N.N. 1981. The effects of fenbendazole and parbendazole on the course of experimental trichinellosis in white mice. Med. Par. i. Paraz. Bolez. **50**: (2) 46-50
- PÉREZ-SERRANO, J CASADO, N; DENEGRI, G; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F. 1994. The effects of albendazole and albendazole sulphoxido combination-therapy on *Echinococcus granulosus in vitro*. International Journal for Parasitology. **24** (2) 219-224.
- PINHEIRO, A.C; ECHEVARRIA, F.A.M; 1990. Sensitivity of *Haemonchus* spp in cattle to antihelmintic treatment with albendazole and oxfendazole. Pesquisa Veterinária Brasileira. **10(1-2)** 19-21.
- PODHAJECKY, K 1964. Ecdysis and copulation of *Trichinella spiralis*. St Helminthology; **1**: 175- 177.
- POMROY, W.E; GETHING, M.A; CHARLESTON, W.A.G; 1988. The efficacy of albendazole against some gastrointestinal nematodes in goats. New Zealand Veterinary Journal. **36** (3) 105-107.
- PRIETO, J.G; ALONSO, M.L; JUSTEL, A; SANTOSL. 1988. Tissue levels of albendazole after *in vivo* intestinal and gastric absorption in rats. Journal of Pharmaceutica and Biomedical Analysis. **6** (6-8) 1059-

1063.

- PRIETO, J.G; JUSTEL, A; DEL ESTAL, J.L; BARRIO, J.P AND ALVAREZ. 1991. Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. Comp. Biochem. Physiol. vol 100c, n°3 pp 397-400
- PRICHARD, R.K; 1986. The pharmacology of anthelmintics in livestock. International Journal for Parasitology 17, 473-482
- PRICHARD, R.K; 1973: The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some antihelmintics. International Journal for Parasitology, 3; 409-417.
- PUNGPAK, S; BUNNAG, D; CHINDANOND, D; RADOMYOS, B; 1987. Albendazole in the treatment of strongyloidiasis. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 18 (2) 207-210.
- PURKESON, M. AND DESPOMMIER, D.D; 1974. Fine structure of the muscle phase of *Trichinella spiralis* in the mouse. Trichinellosis (Ed. C.W. Kim), Intext, New York, pp: 7-23
- QUI, M.D; WEN, L.C; CHENG D.J. 1994 Brain alveococcosis. Therapeutic experience in 14 cases. Chin. Med. J. Engl. 107 (2) 151-154.
- QUINTERO-RODRIGUEZ, E; 1988. Praziquantel vs albendazole for cysticercosis. Neurosurgery. 23(1) 128
- RAHMAN M.S, BRYANT C; 1977. Studies of regulatory metabolism in *Monilezia expansa*: effects of cambendazole and mebendazole. International Journal for Parasitology, 7: 403-409
- RAETHER, W; 1988; Chemotherapy and other control measures of parasitic diseases in domestic animals and man. In parasitology in focus (H. Mehlhorn, Ed), pp. 739-866. Springer-Verlag, Berlin.
- RAMALIGMAM, S; SINNIHAH, B AND KRISHANA, V; 1983. Albendazole and effective single dose broad-spectrum anthelmintic drug. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 944-984.
- RASHID, V.M; 1991. Comparative study of Vermox, albendazole and mebendazole against experimental trichuriasis in mice. Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni. n° 5, 44-46.
- RAEYMAEKERS, A.M.M, VAN GELDER, J.L.H, ROEVENS, L.F.C. Y JANSSE, 1978. Synthesis and anthelmintic activity of alkil (5 acyl-1-H- benzimidazol-2-yl) Arzeim-Forsch Drug Res, 28, 587-594.
- RAJESWARI, B; SINNIHAH, B; HUSSEIN, H. 1994. Socio-economic factors associated with intestinal parasites among children living in Gombak, Malaysia. Asia. Pac. J. Public. Health. 7(1): 21-25.
- RODRIGES, J.M; BORIES, C; EMERY I; FESSI, H Y COL. 1995 Development of and injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against *E. multilocularis*. Metacestode. Interna. J. for Parasit. vol 25, n° 12: 1437-1441
- RODRIGUEZ-CAABEIRO, F. ; CRIADO, A; JIMENEZ, A; ESTEPA, E; 1985. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase activity in *Trichinella spiralis* and the mode of action of some anthelmintics. Wiadomosci Parazytologiczne. 31(3) 253-256.
- RODRIGUEZ-CAABEIRO, F; CRIADO FORNNELIO, A Y JIMENEZ GONZALEZ, A. 1985. A comparative study of succinate dehydrogenase fumarate reductase complex in the genus *Trichinella*. Parasitology. 91: 577-583.

- ROMANOWSKI, R.D, RHOADS M.L, COLGLAZIER M.L, KATES K.C; 1975; Effects of cambendazole, thiabendazole and levamisole on fumarate reductase in cambendazole-resistant and -sensitive strains of *Haemonchus contortus*. Journal Parasitology 61: 777-778.
- ROSSI, V; 1963. Synergism -Review article; J. Pharmaceutical Sciences, vol 52 nº9 919-932.
- RUITENBERG, E.J; A, ELGERSMA; W, KRUIZINGA AND F. LEENSTRA; 1977. *Trichinella spiralis*. infection in congenitally athymic (nude) mice. Immunology 33: 581-587.
- SAMANTA, S; ANSARF, M.Z; 1990. Anthelmintic effect of ivermectin, albendazole, fenbendazole and thiabendazole on larval *Toxocara canis* infection in mice. Indian Journal of Animal Sciences. 60 (10) 1195-1196
- SANZ, F; TARAZONA, J.M; JURADO R; FRIAS, J; TARAZONA, J.V; 1986. A trial of the efficacy of Netobimin against parasitic nematodes of sheep. Medicina Veterinaria. 3 (9) 441-443, 446.
- SANMARTÍN DURÁN, M.L, 1979. Respuesta macrofágica post-tratamiento con mebendazol. Acción sobre la misma de inmunomodificantes. Revista Iberica de Parasitología. 39 (1-4): 625-636.
- SANMARTÍN DURÁN, M.L, MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R; TORO ROJAS, M; RODRIGUEZ CAABEIRO, F. 1980. Acción del Mebendazol sobre larvas enquistadas de *Trichinella spiralis*. I evolución histopatológica. Revista Iberica de Parasitología. 40(1): 27-47
- SATO, N; UCHINO, J; AOKI, S; TAGUCHI, K; NISHIKAWA, M Y col. 1994. Efficacy of benzimidazole- type drug on alveolar echinococcosis. (AE). Nippon-Shokakibyō-Gakkai Zasshi 91 (7) 1197-1204.
- SHAAYA, A.N; KRAUS, C; BAUMAN AND RITSCHER, W.A; 1992. Pharmacokinetics and bioavailability of papaverine HCL after intravenous, itracorporeal and penis topical administration in beagle dogs. Methods Find. Expe. Clin. Pharmacol. 14: 373-378
- SHENG, Y; ZHENG, Q; GUO, F; LIU, B; ZHANG, J; LI, Y; 1994. Pathological studies on alveolar hydatid in gerbils treated with albendazole and praziquantel. Chung-kuo-chi-Sheng-Chung-hsueh-yu-chi-sheng-chung-ping-tsa-chih. 12 (3) 178-181.
- SEVILLE, P. 1989 Albendazole and echinococcal disease. (Correspondence). New Zealand Medical Journal. 102 (878) 565.
- SCHUSTER, R; HIEPE, T; 1987. Efficacy of niclosamide preparations, mebendazole and albendazole against Monieziosis in sheep. Monatshefte für Veterinärmedizin: 42 (5) 182-184.
- SCHUSTER, R; RUSCHER H.J; MEWES, G; 1989. Efficacy of Vermitan (albendazole) against *Dicrocoelium dentriticum* in sheep. Monatshefte für Veterinärmedizin: 44 (13) 457-458
- STEIGER, V; COTTING, J & REICHEN, J. 1990. Albendazole treatment of echinococcosis in humans: effects on microsomal metabolism and drug tolerance. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 47. 347-353.
- SIMEON, D.T; GRANTHAM-MCGREGOR, S.M; WONG, M.S. 1995. *T.trichura* infection and cognition in children: results of a randomized clinical trial. Parasitology. 110 (Pt 4): 457-464.
- SOTELO, J. 1989. Praziquantel for neurocysticercosis. Lancet I: 897.
- SOTELO, J; ESCOBEDO, F AND PENAGOS, P. 1988 . Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis: controlled trial. Arch. Neurol. 45, 532-534

- SOTELO, J; BRUTTO, O.H. DEL; PENAGOS, P; ESCOBEDO, F; TORRES, B; RODRIGUEZ-CARBAJAL, J; RUBIO- DONADIEU, F. 1990. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. Journal of Neurology, 237 (2) 69-72.
- SOUHAILI-EL-AMRI, H; FARGETTON, X; DELATOUR, P Y COL. 1987. Sulphoxidation of albendazole by FAD-containing and cytochrome P450 dependent monooxygenase from pig liver microsomes. Xenobiotica, 17, 1159-1168.
- SOUHAILI-EL-AMRI, H; MOTHE, O; TOTIS, M; MASSON, C; BATT, A; DELATOUR, P & SIEST, G; 1988a. Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome P450c. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 246, 758-764.
- SOUHAILI-EL-AMRI, H; FARGETTON, X; BENOIT, E; TOTTIS, M Y COL., 1988. Inducing effect of albendazole on rat-liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. Toxicology and Applied Pharmacology, 92, 141-149.
- SPALDOVA, R Y CORBA, J. 1979. Relationships between the antitrichinellous effect of seven derivatives of benzimidazole carbamates and their chemical structure. Folia Parasitologica, 26 (2) 145-149.
- SPALDOVA, R; 1981. Efficacy of febantel on *Trichinella spiralis* larvae in white mice. In Trichinellosis (Ed. C.W Kim; E.J Ruitenberg; J.S Teppema) Reedbooks Ltd. Surrey, UK, pp 323-325
- STURCHLER, D; SCHUBARTH, P; GUALZATA, M; GOTTSTEIN, B; OETTLI, A. 1989. Thiabendazole vs. albendazole in treatment of toxocariasis: a clinical trial. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 83 (5) 473-478.
- TANAKA, M; OHMAE, H; UTSUNOMIYA, H; NARA, T; IRIE, Y; YASUROOKA, K. 1989. A comparison of the antischistosomal effect of levo- and dextro praziquantel on *Schistosoma japonicum* and *S.mansonii*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1 (2) 198-203
- TANG Y PRICHARD, 1988a. Scanning electron microscopic observation on the effects of pyquion and microscopic observation on the tegument of *Clonorchis sinensis*. Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 6 (2) 123-125
- TANG, Y.H; XIAO, X.C; LIANG, X.H; WANG, L; WANG, M; Y COL., 1988. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 6 (2) 123-125.
- TANG Y PRICHARD, 1989. Characterization of tubulin from *Brugia malayi* and *brugia pahangi* Mol. Biochem. Parasitol. 32: 145-152
- TAYLOR, D.H; MORRIS D.L; RICHARDS, K.S; 1988. *Echinococcus multilocularis*: in vivo results of therapy with albendazole and praziquantel. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 82 (4) 611-615
- TAYLOR, D.H; MORRIS D.L; REFFIN, D; RICHARDS, K.S; 1989. Comparison of albendazole, mebendazole and praziquantel chemotherapy of *Echinococcus multilocularis* in a gerbil model. Gut, 30 (10) 1401-1405.
- TAYLOR, D.H; MORRIS D.L; 1989b. Combination Chemotherapy in more effective in postpillage prophylaxis for hydatid disease than either albendazole or praziquantel alone. British Journal of Surgery, 76 (9) 954.
- TAYLOR, D.H; RICHARDS, K.S; MORRIS D.L; 1989c. Rapid recovery of *Echinococcus granulossus*

- following successful albendazole therapy in a gerbil model. Journal of Helminthology. 63 (4) 349-352.
- TAYLOR, D.H; RICHARDS,K.S; MORRIS D.L; 1989. Albendazole is effective against established *Echinococcus granulossus* in gerbil: comparison of serum concentrations achieve by gavage and feed administration. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 83 (5) 485-488.
- TESTA.B; 1980; Inhibition du métabolisme des médicaments et impacts therapeutiques. Actualités de Chimie Therapeutique,7; 87-145.
- THEODORIDES,V.J; REW,R.S; 1988. Efficacy of albendazole against helminth parasites of swine. In Proceeding, International Pig Veterinary Society, 10th Congress, 14-17 August, 1988. Rio de Janeiro, Brazil, Brazilian Section (ABRAVES) 266
- THEODORIDES,V.J; KINGSBURY,W.D Y PARISH,R.C. 1976 Anthelmintic activity of albendazole against liver flukes, tapeworms, lung and gastrointestinal roudworms. Experientia. 32 , 702-703
- THEODORIDES,V.J , CHANG,C.J; DICVOLLO,G; GRASS,RR Y col.,1973 Oxibendazole, a new broad spectrum anthelmintic effective against gastrointestinal nematodes domentic animals. Br. Vet. Journal.129, 97-98
- THOMAS,H; 1965, Beitrage zur biologie und mikroskopschen anatomie von *Trichinella spiralis*. Owen, 1835. Tropenmed. Parasitol. 16. 148-180
- TINAR R; DOGAN H; DEMIR S; AKYOL C.V; 1986-1987, publ. 1988. Efficacy of Okzan and albendazole against *Fasciola* spp. and gastrointestinal nematodes in naturally infected sheep. Veteriner Fakültesi Dergisi, 5-6 (1-3, 1-3) pp 181-188.
- TINAR,R; COSKUN, S.Z; DOGAN H; DEMIR,S; AKYOL, V.Ç. 1988. Efficacy of albendazole against nematode and trematode infections in sheep. Veteriner Fakültesi Dergisi, 7 (1-2-3) pp 117-123.
- TOMA,S Y Col., 1993.Enferm. Infecc. Microbiol. Clin 11. (2) 113-114
- TODOROV,T; VUTOVA,K; PETKOV,D; MECHKOV,G; KOLEV,K. 1988. Albendazole treatment of human cystic echinococcosis. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine. 82 (3) 453-459.
- TOGNOLI,L.E. 1959. Boll.Chim.Farm.98. 201.
- TORRADO-DURÁN, S; 1994. Estudio farmaceutico de Nuevas Formulaciones Galénicas de Albendazol. Tesis Doctoral.
- TOWNSEND, L.B Y WISE,D.S. 1990. The synthesis and Chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. Parasitology Today. 6 (4) 107-112
- TYNES.R & HODGSON,E ;1983; Oxidation of thiobenzamine by the FAD-containing and cytochrome p-450 dependent monooxygenases of liver and lung microsomes. Biochemical Pharmacology 32, 3419-3428.
- VASHI,D.B, CLARK,J.N AND LINDO,N.A 1983. US Patentt 4406893.
- VASSILEV,G.D.1993. Activity of ivermectin and albendazole in hte control of gastrointestinal nematode parasites and Growth perfomance of two years old beed cattel. Zimbabwe Vet. J. vol 24. 4 121-149.
- VAZQUEZ,A.D; CORROY NAVARRO,M; COUTIÑO OCAMPO,M DEL C. 1988. Evaluation of efficacy of albendazole in the treatment of strongyloidiasis in humans. Boletin Chileno de parasitologia. 43 (3-4) 61-

- LOPEZ, V.; SOTELO, J. 1992. The course of seizures after treatment for cerebral cysticercosis. New England Journal of Medicine, 327 (10) 696-701.
- DE JONCKHEERE, A.; BORGERS, M.; VANPARIJS, O. Y. THIENPONT, 1976. The effects of mebendazole on the structure of cestodes. In Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships (Ed Bossche H) pp 605-618 North-Holland Publishing, Amsterdam.
- LOPEZ, V.; TOMASOVICOVÁ, R.; STPCZYNSKA, S. 1992a. Pharmacokinetics of <sup>3</sup>H- mebendazole in the course of experimental trichinellosis. Helminthologia, 29: 207-210.
- LOPEZ, V.; TOMASOVICOVÁ, R.; STPCZYNSKA, S. 1992b. Comparative pharmacokinetics of mebendazole and cambendazole in the course of the intestinal phase of trichinellosis in mice. Helminthologia, 29: 81.
- CHANDRASEKHAR, S.P.; RODE, A.M.; SAPRE, V.A.; SARODE, D.E.; 1991. Anthelmintic efficacy of ivermectin and mebendazole against gastrointestinal helminth infection in buffalo calves. Indian Journal of Veterinary Medicine, 16 (1-2) 70-71
- DE JONCKHEERE, A.; DENHAM, D.A. 1983. The immune response. In Trichinella and trichinosis, W.C. Campbell (ed). Plenum Press, New York, p 265-308.
- DE JONCKHEERE, A.; LIGHT, D.R.; WALSH, 1982. Chiral sulfoxidations catalized by rat liver cytochromes P-450. Biochemistry 21: 2499-2507.
- DE JONCKHEERE, A.; CAMPBELL, W.C. 1983. Anatomical pathology. In Trichinella and Trichinosis. (ed Campbell, W.C) Plenum Press, New York, USA, 173-200
- MAIRDAN, M.; JIANG, W.; YUNHAI, W.; JIUHUI, Z.; NEW, R.R. Y. CRAIG, P.S. 1993 Efficacy of mebendazole for the treatment of *E.multilocularis* in rats. In International Archives of the Pharmacology, XXXI. (Edited by Yao M.Y) pp 438-439
- ZHANG, H.W.; MUHMUT, ZOU, P.F.; NEW, R.R.; CRAIG, P.S. 1994. Initial observation on mebendazole in combination with emetidine for treatment of human cystic echinococcosis. Ann Trop. Med. 88 (1) 49-52.
- PEI-FAN; WEN-GUANG, Y.; JIAN, L.; YUN-HAI, W.; JIU-HUI, Z.; NEW, R.R. Y. CRAIG, P.S. 1994. Mebendazole chemotherapy for human cystic and alveolar echinococcosis in north-wertern China. Trans. of Soc. of Trop. Med. and Hyg. 88, 340-343.
- DE JONCKHEERE, A. 1990. Nuevos medicamentos antihelmínticos. Revista Médica de Chile. 118: 1021-1027.
- DE JONCKHEERE, A.; SAVER, B.; CUTHY, R. Y. NADAL, D.; 1993. Intestinal coinfection with *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium* in a human immunodeficiency virus infected child with chronic diarrhea. Clin. Infect. Dis. 17 (3) 480-483.
- DE JONCKHEERE, A.; 1991. Efficacy of albendazole, levamisole and mebendazole against gastrointestinal nematodes with emphasis on inhibited early fourth stage *O. ostertagi* larvae. Veterinary Parasitology, 40 (1-2) 1-10.
- DE JONCKHEERE, A.; OCHSENDORF, F.R.; MILBRADT, R.; 1993. Current therapy of cutaneous larva migrans. Hautarzt 48: 462-465.

