

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO: 2012-2014

Legajo N°:2525

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Rule

NOMBRES: Roberto

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): robertorule@yahoo.com.ar

2. TEMA DE INVESTIGACION

Farmacocinética

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Becario Fecha: 1984

ACTUAL: Categoría: Investigador Adj. desde fecha: 1995

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: La Plata

Facultad: Ciencias Medicas

Departamento: Clínicas

Cátedra: Farmacología Aplicada

Otros:

Dirección: Calle: 60 y 120 N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 423 6710

Cargo que ocupa: JTP

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

¹ Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Farmacocinética y evaluación de daño tisular de dos preparados de ceftazidima administrados vía intramuscular en cabras sin producción lechera

La ceftazidima es una cefalosporina llamada de tercera generación, su farmacocinética ha sido estudiada. Los antibióticos preparados con vehículos de liberación lenta y administrados por vía intramuscular pueden provocar daño en el tejido muscular. Las enzimas que se elevan con una relativa especificidad durante una injuria tisular son las TGO, LDH y CK.

Objetivos. Los objetivos del trabajo fueron determinar el comportamiento farmacocinético y evaluar el daño tisular de dos preparados de ceftazidima administrados vía intramuscular a cabras sanas sin producción lechera

Se utilizaron, en un diseño experimental cruzado, cabras criollas sanas ($n=12$) sin producción en dos experiencias (E1 y E2), dejando transcurrir dos semanas entre una y otra. Durante la E1 se les administró a las cabras vía intramuscular una monodosis de pentahidrato de ceftazidima (20mg/kg) (formulación convencional). Cada frasco ampolla conteniendo 1 gramo de antibiótico fue preparado con solución salina normal (1 gramo c.s.p. 10 ml). Posteriormente se realizó la E2 donde los animales recibieron una monodosis de pentahidrato de ceftazidima (20 mg/kg).

Cada frasco ampolla conteniendo 1gr de antibiótico fue preparado con solución salina 50% y propilenglicol 50% (formulación liberación lenta) (c.s.p. 10ml). Durante el transcurso de la E1 y E2 se tomaron muestras sanguíneas a tiempos controlados: previamente y a las 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 horas postadministración del antibiótico. Las concentraciones-tiempo de ceftazidima en suero fueron determinadas utilizando un método biológico (*E. coli* ATCC: 25922). Las cuantificaciones de los niveles séricos de las enzimas TGO, CK Y LDH fueron realizadas por espectrofotometría (método colorimétrico).

Los parámetros farmacocinéticos se presentan en la Tabla 1. El tiempo medio de absorción ($t_{1/2ab}$) de la formulación larga acción fue 2.4 veces superior a la observada en la formulación convencional, siendo las vidas medias ($t_{1/2}$) y biodisponibilidad relativa (f) similares para las dos formulaciones. La GOT y LDH evaluadas durante 24 horas no presentaron diferencias ($P > 0.05$) postadministración de las dos formulaciones de ceftazidima. No obstante, la administración intramuscular de ceftazidima larga acción al igual a lo observado en cabras tratadas con tetraciclinas con formulación lenta los niveles séricos de CK fueron diferentes ($P < 0.05$) respecto a las formulaciones convencionales.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de ceftazidima preparada en formulaciones de larga acción (FLA) y convencional (FC) y administradas vía intramuscular en cabras (n=12) sin producción lechera

Parámetros (Unidades)	FLA (Media ± DE)	FC	Estadística
λ_z (h ⁻¹)	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.1	NS
K_{ab} (h ⁻¹)	0,9 ± 1.7	3.5 ± 2.5	S
$t_{1/2}$ (h)	1.6 ± 0.9	2.0 ± 0.4	NS
$t_{1/2ab}$ (h)	0.6 ± 0.5	0.2 ± 0.1	S
C_{max} (µg/ml)	46.5 ± 9.6	55.5 ± 3.8	NS
t_{max} (h)	1.3 ± 0.7	0.7 ± 1.1	NS
ABC (µgh/ml)	201.8 ± 24.5	219. ± 21.6	NS
f relativa (%)	92.1 ± 19.9-.....	-

Tabla 2. Valores séricos (Media ± D.E.) de las enzimas GOT, LDH y CPK obtenidos postadministración de ceftazidima (formulaciones convencional y larga acción) a cabras (n =12) sin producción lechera

Tiempo (Horas)	Formulación convencional (U/L) (Media ± D.E.)			Formulación larga acción (U/L) (Media ± D.E.)		
	GOT	CPK	LDH	GOT	CPK	LDH
0	123 ± 16 a	134 ± 44 a	43 ± 67 a	139 ± 5 a	187 ± 66 b	390 ± 70 a
2	119 ± 17 a	225 ± 17 a	428 ± 66 a	127 ± 13 a	475 ± 182 b	368 ± 87 a
6	130 ± 15 a	443 ± 288 a	459 ± 99 a	131 ± 11 a	1393 ± 499 b	514 ± 133 a
8	135 ± 91 a	374 ± 243 a	373 ± 101 a	131 ± 16 a	1717 ± 1299 b	476 ± 198 a
12	139 ± 6 a	424 ± 267 a	504 ± 31 a	126 ± 14 a	1300 ± 675 b	680 ± 490 a
24	130 ± 13 a	216 ± 91 a	437 ± 128 a	127 ± 10 a	514 ± 359 b	478 ± 146 a
48	ND*	ND	ND	128 ± 7	138 ± 54	391 ± 100
72	ND	ND	ND	132 ± 13	140.6 ± 32.3	489 ± 134
96	ND	ND	ND	115 ± 7	132 ± 28.7	432 ± 123

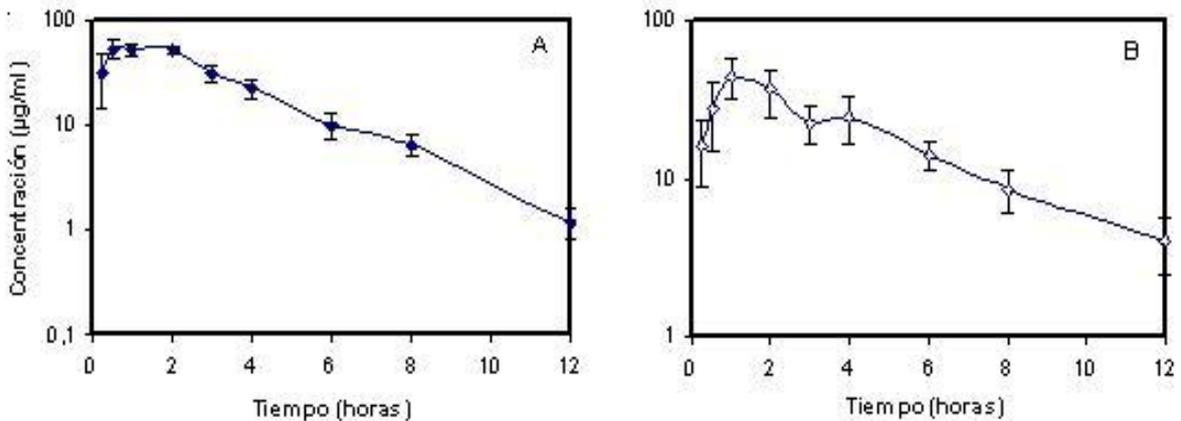


Figura 1. Concentraciones-tiempo en suero de ceftazidima (media \pm D.E.), preparada en formulacion convencional (A) y larga accion (B), administrada via intramuscular en cabras ($n= 12$) lechera sin produccion.

En conclusión, aunque las concentraciones-tiempo obtenidas a las 12 horas postadministración de ceftazidima larga acción fueron más elevadas respecto a la preparada convencionalmente, ambas formulaciones presentaron concentraciones sericas, durante dicho tiempo, por encima de las CIM para gérmenes sensibles. La observación de valores aumentados de CK después de la administración de la formulación de liberación lenta de ceftazidima respondió a la presencia de daño de tejidos en el sitio de administración provocado por la preparación farmacéutica del antibiótico.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES. Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.

Mónica Giusti, Raúl Lacchini, Osvaldo H. Farina, Roberto Rule. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS Y PRODUCTIVIDAD DE CONEJOS ALIMENTADOS CON DIETAS NORMO E HIPOPROTEICA. BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND PRODUCTIVITY OF RABBITS FED LOW AND

NORMO-PROTEIN DIETS. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2012, vol.46, n.2, pp. 213-220. ISSN 0325-2957

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue realizar un modelo experimental con la finalidad de evaluar la bioquímica sanguínea, hematología e índices de productividad de conejos alimentados con dietas normo e hipoproteica. Los conejos ($n= 24$), con distintos grados de cruzamiento entre raza Californiana y Neocelandesa, destetados, edades (rango) de 30-34 días, pesos corporales (rango) de 730-770 gramos. fueron separados aleatoriamente en dos grupos (NP y HP). El grupo NP fue alimentado con balanceado comercial (17 % PB) y el HP con un alimento formulado con cereales y algunos de sus subproductos de manera que su porcentaje de proteína bruta (PB) fuera de 12,2 %. A los animales se los pesó semanalmente, estimó el consumo semanal de alimento y recolectaron muestras sanguíneas cada 14 días durante 8 semanas. Los índices productivos (crecimiento, rendimiento, conformación, despiece de la canal) fueron diferentes entre los animales de las dieta NP vs. HP ($P < 0.05$). El contenido de urea en plasma fue el parámetro bioquímico que nos permitió relacionar alimentación normo e hipoproteica y producción. En conclusión los resultados obtenidos mostraron que el nivel de proteínas en la dieta de conejos produce modificaciones en sus índices de productividad.

Palabras clave: conejos - dietas - parámetros bioquímicos y hematológicos - productividad.

Importancia del trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Fundamentamos la realización del presente trabajo, entre otros, en la Ley 11.553 sancionada por el Senado y Camara de Diputados de Provincia de Buenos Aires que dice en algunos de los articulos lo siguiente:

ARTICULO 1°: **Declarase de Interés Provincial a la cunicultura**, su promoción y desarrollo, como así también toda otra actividad relacionada directa o indirectamente con la misma.

ARTICULO 3°: Item c. **Impulsar, apoyar y realizar la investigación**, experimentación y enseñanza tanto privada como estatal, para lograr el mejoramiento de los productos de la cunicultura. Item h. **Realizar tareas de extensión e investigación técnica y científica** de coordinación con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y **con la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.**

A nivel nacional la cunicultura se encuentra enmarcada bajo la Ley 23.634 donde se declara "De interés Nacional y Prioritario la Promoción, Fomento y Desarrollo de La Cunicultura" creándose La Comisión Nacional de Cunicultura dependiente de La Secretaria de Ganadería Agricultura Pesca y Alimentación de la Nación.

Ademas, el tema desarrollado en el presente periodo contribuye en la búsqueda de soluciones de la problemática sanitaria de los conejos en una forma racional e integral. Brindando apoyatura científica y técnica en el uso de antibióticos a los productores y profesionales Veterinarios y Agrónomos que realizan sus actividades en cunicultura, a la Salud Publica evitando residuos de dichos quimioterapicos y selección de cepas resistentes por usos indiscriminados, a la economía previniendo gastos innecesarios y a la Provincia de Buenos Aires, generando información científica que permita la capacitación laboral de sus profesionales y en definitiva formación de recursos humanos tan necesarios para su desarrollo.

CREACION DE UNA GRILLA DE PUNTAJE PARA LA EVALUACION DE REVISTAS CIENTIFICAS Y TECNICAS DE APICULTURA.

Leveratto D, Perez R, Rule R, Reynaldi F. Trabajo Completo IV Congreso Nacional y III Congreso Internacional de Enseñanza de las Ciencias Agropecuarias. Publicado en el Tomo 2 páginas 1469 a 1476. Libro impreso en Multigroup S.R.L. Belgrano 520, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. En el mes de agosto de 2012.

Resumen

Apimondia es la institución que nuclea a los apicultores de todo el mundo, siendo Argentina en el año 2011, sede del 42^a Congreso Internacional de Apicultura. Profesores de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de la Plata fueron seleccionados como organizadores del Concurso Internacional de Revistas Científicas y Técnicas de Apicultura, realizado en el marco del Congreso. No se disponía de un sistema oficial de puntaje para el concurso, por lo que se creó un modelo de calificación. Se consideraron tres bloques: I Edición, Diagramación y Diseño; II Contenidos; III Secciones y Artículos, con un total de 100 puntos. Se generó una grilla con puntajes correspondientes a los bloques analizados. Participaron seis revistas de diferentes partes del mundo. Los resultados fueron: 1^a Oro 71,1 puntos, 2^a Plata 63,5 puntos, 3^a Bronce 58,1 puntos y mención especial 55,7 puntos.

La creación y utilización de una grilla para premiar a los participantes, permitió disponer de una forma de evaluación de carácter objetiva, neutral y predictiva, que facilitó la selección y premiación. De esta forma, nuestra Facultad tuvo un rol participativo y protagónico, proponiendo este modelo para futuras ediciones de Apimondia.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

Roberto Rule et al. PHARMACOKINETICS AND TISSUE PENETRATION OF CEFTAZIDIME ADMINISTERED DURING HYSTERECTOMY AND

OOPHORECTOMY IN CANINE FEMALES. Latin American Journal of Pharmacy.

We determined the pharmacokinetics and tissue penetration of ceftazidime during abdominal hysterectomy and oophorectomy in canine females. The study consisted in Trial 1 (T1) and Trial 2 (T2). during T1 the animals ($n=30$) received a single dose of ceftazidime (20 mg/kg) intravenously. Blood was then drawn and tissue samples removed during time intervals. For T2, 10 animals from T1 were selected for pharmacokinetic studies. The pharmacokinetic parameters (mean \pm SD) were: $t_{1/2} = 1.03 \pm 0.33$ h; $AUC = 100.6 \pm 46.9$ $\mu\text{g/ml.h}$; $V_{ss} = 343.1 \pm 166.8$ ml/kg; $CL = 174.5 \pm 50.2$ ml/kg. The mean ceftazidime concentrations C_{max} (0.5-1 h) and C_{min} (2-3 h) in the tissues were: right ovary= 52.8 and 0.3; left ovary= 54.6 and 0.4; body of the uterus= 38.2 and 1.1; peritoneum= 34.5 and 4.6; ST=32.3 and 8.0 and skin= 54.6 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively. These concentrations of ceftazidime are considered sufficient to treat most surgery-associated aerobic infections.

Albo, G.N.; Reynaldi, F; Avellaneda, E; Leniz, D.; Rule R. Determinación de las concentraciones-tiempo de dos preparados de tilosina administrados en colonias de *apis mellifera* a campo XI Congreso Latinoamericano de Apicultura - 2014 FILAPI. 3 al 6 de septiembre de 2014.

La loque americana es la enfermedad bacteriana más importante que afecta a las larvas de abejas. Su agente etiológico es el *Paenibacillus larvae*, bacteria esporulada que complejiza su estrategias de control. La tilosina es el único antibiótico aprobado para su uso que no ha presentado resistencia bacteriana. El objetivo del trabajo fue determinar las concentraciones-tiempo de tilosina, administrada en colonias de *Apis mellifera* a campo. Se utilizaron 9 colonias estándar (tipo Langstroth) de abeja melífera italiana (*A. mellifera ligústica.*, L). Se realizaron los siguientes tratamientos: T1: 1 g de de tartrato de tilosina en paper-pack (PP); T2: 1 g de tartrato de tilosina en espolvoreo (E); T3: Testigo sin antibiótico (T), con 3 repeticiones por tratamiento. El tratamiento T1 fue aplicado dos veces con un intervalo de quince días, sobre los cabezales de los cuadros de cría. El tratamiento T2 fue administrado una vez por semana durante cuatro semanas mediante espolvoreo sobre los cabezales de los cuadros de cría. Se recolectaron 50 larvas de abejas menores de 72 h por colmena, tres veces por semanas, durante cuatro semanas (período de aplicación de los tratamientos). Postadministraciones de los tratamientos T1 y T2 se realizaron muestreos de larvas semanalmente por un período de tres meses. Para cuantificar las concentraciones de antibiótico se uso un método biológico (*Geobacillus sthearothermophilus*). Un ANOVA determinó diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) y un posterior test de medias mostró que los tratamientos no son bioequivalentes Durante tratamiento T2, realizado mediante espolvoreado, se observó una mayor pendiente de eliminación respecto a T1, con concentraciones inferiores a 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a partir de los 40 días postadministración del antibiótico. Dicho comportamiento en colonias de abejas permitiría evitar una posible sobreexposición al antibiótico, disminuyendo de este modo una la posible selección de cepas con perfil de sensibilidad aumentado.

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

7.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

FARMACOCINETICA SERICA Y TISULAR DE CEFTAZIDIMA ADMINISTRADA EN PERRAS DURANTE LA CASTRACION. De Gatica L, Baschar H, Rule R. XIII Jornadas de Divulgacion Tecnico Cientificas 2012. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Casilda 6 de agosto de 2012.

FARMACOCINETICA SERICA DE CEFTAZIDIMA ADMINISTRADA EN PERRAS DURANTE LA ANEXO HISTERECTOMIA ABDOMINAL. De Gatica L, Villagra S, Arauz S, Rule R. Encuentro Regional de la Asociación Internacional de Monitoreo Terapéutico de Drogas y Toxicología Clínica. Buenos Aires, 27 y 28 de noviembre de 2012.

CREACION DE UNA GRILLA DE PUNTAJE PARA LA EVALUACION DE REVISTAS CIENTIFICAS Y TECNICAS DE APICULTURA. Leveratto D, Pérez R, Rule R, Reynaldi F. Trabajo presentado en el IV Congreso Nacional y III Congreso Internacional de Enseñanza de las Ciencias Agropecuarias. La Plata, 9,10 y 11 de septiembre de 2012.

PHARMACOKINETICS AND TISSUE DAMAGE EVALUATION OF TWO PREPARATIONS OF CEFTAZIDIME ADMINISTERED VIA INTRAMUSCULAR ROUTE IN GOATS. Lacunza J, Prozzi G, Villagra S, Muro A, Cordiviola C, Rule R. 20 Congreso Latinoamericano de Farmacología y Terapéutica. 5^{to}. Congreso Iberoamericano de Farmacología. 11^{no} Congreso Nacional y 5^{to} Internacional de la Sociedad Cubana de Farmacología. 21 al 25 de octubre de 2013. Palacio de la Convenciones, La Habana, Cuba.

CINETICA DE CEFTAZIDIMA ADMINISTRADA VIA INTRAMAMARIA EN CABRAS LECHERAS EN PRODUCCION SANAS Y MASTITICAS. Lacunza J, Prozzi G, Farina O, Rule R. I Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, realizado en la FCM de la UNLP los día 28, 29 y 30 de noviembre de 2013

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

8.2 PATENTES O EQUIVALENTES. *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

Dr. Francisco Reynaldi, Investigador Asistente, Carrera del Investigador Científico del CONICET. Título: COMPORTAMIENTO CINETICO EN COLMENAS DE DIFERENTES BIOCIDAS ADMINISTRADOS VIA DIGESTIVA EN ABEJAS ADULTAS. 2012-2013

Director A. Alippi, Co-director R. Rule.

Proyecto 11-A147 del programa de Incentivos Universidad Nacional de La Plata (Período 2010-2013). Título: Producción de carne y leche caprina en sistemas semiintensivos. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

Secretaría de Ciencia y Técnica. UNLP.
Director R. Lacchini. Co-directores: R. Rule, A.A. Ruiz.

- 12. DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

Doctorando Lic. Sergio Villagra. Tema de Tesis Doctoral: EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO CINETICO, Y DE LA ACTIVIDAD CONTRA Trypanosoma cruzi, DE TRIFLURALIN ADMINISTRADO EN CONEJOS. En ejecución, Facultad de Cs. Vet. UNLP. Aprobado el primer informe de avance. Año 2013. Director R. Rule

- 13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

XIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2012. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Casilda 6 de agosto de 2012. Presentación del trabajo: Farmacocinética sérica y tisular de ceftazidima administrada en perras durante la castración. Autores: De Gatica L, Baschar H, Rule R.

Encuentro Regional de la Asociación Internacional de Monitoreo Terapéutico de Drogas y Toxicología Clínica. Buenos Aires, 27 y 28 de noviembre de 2012. Participación: Presentación del trabajo titulado: Farmacocinética sérica de ceftazidima administrada en perras durante la anexa histerectomía abdominal. De Gatica L, Villagra S, Arauz S, Rule R.

Encuentro Regional de la Asociación Internacional de Monitoreo Terapéutico de Drogas y Toxicología Clínica. Buenos Aires, 27 y 28 de noviembre de 2012. Participación: presentación del trabajo titulado: Índice de penetración tisular de ceftazidima administrada en perras durante la anexa histerectomía abdominal. De gatica L, Villagra S, Prozzi G y Rule R.

I Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, realizado en la FCM de la UNLP los días 28, 29 y 30 de noviembre de 2013. Participación: Asistente.

Encuentro Regional de la Asociación Internacional de Monitoreo Terapéutico de Drogas y Toxicología Clínica. Buenos Aires, 27 y 28 de noviembre de 2012. Participación Asistente: total de horas docentes 20.

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

Subsidio Institucional CIC-PBA 2012-2013.

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

Representante Regional de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental.

Scientific Board. Online Journal of Veterinary Research.

Miembro titular del jurado de tesis doctoral de la Médica Veterinaria María Laura Meneses. Título del trabajo: "Desarrollo de un modelo experimental para el estudio in vivo de la farmacodinamia de los antimicrobianos". Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata. Tiempo insumido 10 jornadas laborables (aprox.).

Revisor del trabajo científico titulado: Influence of E. coli lipopolysaccharide induced fever on the plasma kinetic of ceftriaxone in Black-Bengal goats. Veterinarski Arhiv. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Universidad of Zagreb, Croatia.

Miembro del Comité de Revisión de Resúmenes de trabajos originales de XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, Casilda, agosto 2013.

19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Jefe de Trabajos Prácticos. Farmacología Aplicada FCM UNLP. 10 hs. semanales.

20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

FARMACOCINETICA DE CEFTAZIDIMA ADMINISTRADA VIA PARENTERAL EN CONEJOS ALIMENTADOS CON DIETA RESTRINGIDA EN PROTEINAS.

Introducción

La ceftazidima es una cefalosporina de tercera generación activa contra una gran variedad de germenos que incluye enterobacterias (*E. coli*, *C. diversus*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. Agglomerans*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani*, *S. marcescens*, *Salmonella* y *Sigella*) y *P. aeruginosa* fundamentalmente (O Callaghan *et al.*, 1980; Bolant *et al.*, 1985; Thornsberry, 1985). En general, para todos los microorganismos enunciados la concentración inhibitoria mínima de ceftazidima no supera los 4 µg/ml (O Callaghan *et al.*, 1980; Thornsberry, 1985).

La ceftazidima presenta en general buen pasaje a pulmón, líquidos corporales y baja unión a proteínas plasmáticas (Abd El-Aty *et al.*, 2001, Goodman and Gilman, 2003; Rule *et al.*, 1991, 1993, 1996, 2011) Su eliminación del organismo se realiza por excreción urinaria casi exclusivamente, no evidenciándose metabolización ni cambios cinéticos por administraciones repetidas (Goodman and Gilman, 2003). A diferencia de la gentamicina, antibiótico con quien comparte espectro antibacteriano, en esta cefalosporina no se han observado efectos nefrotóxicos (Capel *et al.*, 1981), resultando esta propiedad de suma utilidad en la práctica clínica.

Los objetivos del presente trabajo son determinar la farmacocinética de ceftazidima administrada vía parenteral en conejos alimentados con dietas normo e hipoproteicas.

Materiales y Métodos

Animales: doce conejos machos, sanos, serán asignados randomizadamente a dos experimentos (E1 y E2).

Raciones de los animales: Sobre la base del tipo y composición de los alimentos, cantidad diaria consumida durante el día y estado fisiológico de los animales (requerimientos) se les suministrará una ración completa a los animales de la E1. En la E2 se restringirá el aporte proteico de la ración diaria de los animales. Las formulaciones de las raciones y tiempo de los experimentos serán realizados considerando las propuestas de Giusti *et al.*, 2013.

Antibiótico, dosis y vía de administración. Se administrará ceftazidima (10 mg/kg) vía intramuscular a todos los animales. Postadministración del antibiótico se recogerán muestras sanguíneas a tiempos controlados.

Cuantificación del antibiótico. La cuantificación de la ceftazidima en plasma se realizará utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC): 250 µl de plasma obtenido de los conejos serán mezclados con 100 µl de buffer

$\text{PO}_4\text{H}_3/\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,02 molar, 20 μl de ácido perclórico y 250 μl de metanol, centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. Previa separación del sobrenadante será inyectado en una columna $\mu\text{bondapak C-18}$ (4b) conteniendo una fase móvil de ACN al 16% en buffer $\text{PO}_4\text{H}_3/\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,02 molar y pH 2,6. La detección será realizada por UV (254 nm). Se validará la técnica con los parámetros clásicos de linealidad, reproducibilidad, recuperabilidad, límite de detección y de cuantificación.

Análisis cinético y estadístico. El comportamiento cinético de la ceftazidima será descrito utilizando modelos compartimentales y no compartimentales (Gibaldi, 1991).

Los resultados de las variables cinéticas de ceftazidima administrada en conejos con alimentados con dietas hipo e hiperproteicas serán comparadas estadísticamente teniendo en cuenta la siguiente premisa: si la distribución es normal se realizarán métodos paramétricos, caso contrario se utilizarán métodos no paramétricos.

Bibliografía

Abd El-Aty AM, Goudah A, Abo El-Sooud K 2001 Pharmacokinetics, intramuscular bioavailability and tissue residue profile of ceftazidime in rabbit model. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108(4):168-71.

Bolant L, Dayer P, Anckenthaler R: Clinical pharmacokinetics of the third generation cephalosporine. *Clin Pharmacokinet* 10: 101, 1985.

Capel EK, Pratt DAH: Renal tolerance of ceftazidime in animals. *J Antimicrob Chemother* 8 (Suppl B), 241, 1981.

Gibaldi M, Perrier D. (1982). *Pharmacokinetics*. In: Multicompartment Models. Marcel Dekker editor. 2nd edn. New York. 47-98.

Giusti M, Lacchini R, Farina H, Rule R. Parámetros bioquímicos, hematológicos y productividad de conejos alimentados con dietas normo e hipoproteica. Biochemical and hematological parameters and productivity of rabbits fed low and normo-protein diets. *Acta bioquím. clín. latinoam.*, vol.46, n.2, pp. 213-220. 2012.

Goodman and Gilman (2003) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. McGraw-Hill Interamericana, edn. México, D.F., pp 1207-1236.

O Callghan CH, Acred P, Harper PB, Ryan DM, Kirby SM: GR 20263, a new broad spectrum cephalosporin with antipseudomonal activity. *Antimicrobial Agents Chemother* 17: 876, 1980.

Rule R, Rubio M, Perelli MC (1991) Pharmacokinetics of ceftazidime in sheep and its penetration into tissue and peritoneal fluids. *Res Vet Sci* 51:233-238.

Rule R; Martiarena N; Rubio M; Magadan A. (1993). Farmacocinética de ceftazidima en prematuros. *Medicina* 53(3):207-210.

Rule R, Quiroga GH, Rubio M, Buschiazzo H, Buschiazzo PM (1996) The pharmacokinetics of ceftazidime in lactating and non-lactating cows. *Vet Res Commun* 20:543-550.

Rule R, Villagra S, Barrena P, Lacchini R, Reynaldi FJ. Pharmacokinetics of ceftazidime administered to lactating and non-lactating goats. *Journal of the South African Veterinary Association*, 82(4):219-223. 2011

Thormsberry C. Review of in vitro activity of third generation cephalosporins and other newer Beta Lactam antibiotics against clinically important bacteria. *Am J Med* 79 (Suppl 2A): 14, 1985.

SUBPROYECTO

Farmacocinetica de distintos preparados de trifluralin administrado en conejos.

2- OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVO GENERAL

- Se desarrollarán preparados con una dinitroanilina (trifluralin) y posteriormente serán evaluados cinéticamente administrándolos vía parenteral en conejos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Validar técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para detectar y cuantificar trifluralin.
- Desarrollar preparados de trifluralin conteniendo formulación que permitan su administración parenteral.
- Definir el comportamiento cinético de tres formulaciones de trifluralin administrados en dosis única y múltiples por vía endovenosa e intramuscular en conejos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Es factible definir el comportamiento cinético de distintos preparados de trifluralin a partir de los valores de concentraciones sanguíneas mediante una técnica de HPLC/UV.

El tratamiento de la enfermedad en el periodo agudo es a base de fármacos que presentan serias limitaciones, que incluyen efectividad variable y efectos colaterales y de toxicidad. Algunos fármacos son efectivos (Ej. alopurinol,

lovastatina, sinefungina) (Stopani, 1999; Croft, 1999), pero la falta de selectividad contra *Trypanosoma cruzi*, hace que la investigación de nuevos compuestos sea relevante y necesaria (i.e: trifluralin, alquilfosfolipidos, D0870, bifosfonatos y residronato) (Stopani, 1999; Traub-Cseko *et al.*, 2001; Zaidenberg *et al.*, 1999; Croft *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 2003; Urbina 1999; Marra *et al.*, 2002; Docampo and Moreno, 2001; Garzoni *et al.*, 2004^a; Garzoni, *et al.*, 2004^b). Zaindeberg *et al.* (2006) hallaron efectividad en el tratamiento crónico de la enfermedad en el modelo murino ratón utilizando una dinitroanilina llamada trifluralin.

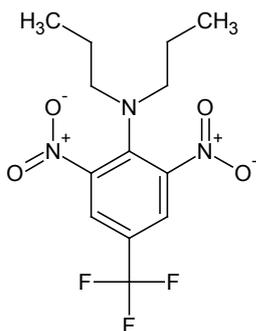
.- INTRODUCCION

El Trifluralin es una dinitroanilina ampliamente utilizado como herbicida para control de plantas herbáceas consideradas malezas. Es llamado comercialmente como Treflan, Triflurex, Olitref, Tri-4, Trigard, Triplen, Tristar y Zeltoxone (Budavari, 1989; Tomlin, 1994) y es frecuentemente utilizado en cultivos de soja y algodón.

El nombre químico de trifluralin según es:

α,α,α -Trifluoro-2,6-dinitro-N,N,N dipropil-p-toluidina, presentando la siguiente fórmula química $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$.

Trifluralin es un cristal amarillo- naranja con un peso molecular de 335,29, soluble en acetona, cloroformo, etanol, acetonitrilo, tolueno, acetato de etilo y prácticamente insoluble en agua (<0,005 ppm) (Tepe & Scroggs, 1967; Weber & Mónaco, 1972; Tomlin, 1994). Diluido en soluciones metanólicas exhibe una máxima absorción de la luz ultravioleta a 275 y 376 μm (Tepe & Scroggs, 1967). Su estructura molecular es la siguiente:



(Budaravi, 1989)

Propiedades físicas y químicas:

Cristales amarillos sin olor apreciable. Su punto de fusión se encuentra entre los 46 y 47°C. Su densidad relativa es de 1.36 a 22°C. Su solubilidad en agua es de 18.4 mg/L a 25°C y pH 5. Su solubilidad en diferentes compuestos orgánicos a 25°C es la siguiente: en acetona, acetonitrilo y cloroformo es > 100 g/100 ml; en xileno de 81 g/100 ml; en etanol de 7 g/100 ml; en dimetilformamida DE 82 g/100 ml; en dioxano de 83 g/100 ml; en hexano de 5 a 6.7 g/100 ml; en metanol de 3 a 3.4 g/100 ml; en 2-metoxietanol de 44 g/100 ml y en metil etil cetona de 88 g/100

ml, su presión de vapor de 4.58×10^{-5} mm Hg a 25°C y su Constante de la Ley de Henry es de 1.03×10^{-4} $\text{ATM m}^3/\text{mol}$ a 20°C . Esta sustancia se descompone al calentarse o al arder produciendo gases tóxicos y corrosivos que incluyen a los óxidos de nitrógeno y al fluoruro de hidrógeno.

Mecanismos de acción del Trifluralin:

El modo de acción principal del trifluralin contra las plantas es mediante la vía antagónica de las tubulinas (Hess & Bayer, 1974).

El Trifluralin no solo presenta actividad herbicida sino también antifúngica y antiprotozoárica (Chan *et al.*, 1993, 1995; Fidalgo *et al.*, 2004; Zaidenberg *et al.*, 1999, 2006).

Cinética:

El comportamiento cinético del trifluralin ha sido estudiado en animales (ratas, perros, ratón) (Emerson and Anderson, 1966; Heck, *et al.*, 1977; Erkog and Menzer, 1985; Zaidenberg *et al.*, 2009). Cuando el trifluralin fue administrado intraperitonealmente en ratas se observó una alta absorción y pasaje a tejidos grasos (Heck *et al.*, 1977). En tanto, el trifluralin cuando fue administrado vía peroral en ratas presentó dos picos de concentraciones plasmáticas, el primero a 1 hora y el segundo a las 22 horas postadministración y una vida media de eliminación plasmática de 3.5 horas (Dow *et al.*, 2002).

El trifluralin, en general, es extensa y rápidamente degradado por N-desalquilación, nitro reducción, hidroxilación alifática y ciclización, resultando una continua acumulación de una mezcla heterogénea de productos polares (Emmerson & Anderson, 1966; Probst *et al.*, 1967; Golab *et al.*, 1969; Erkog & Menzer, 1985). En comparación, la fotodescomposición involucra significativamente la N-desalquilación, nitro reducción y ciclización (Letis & Crosby, 1974). Observando la administración oral, el trifluralin es pobremente absorbido y ampliamente metabolizado en el intestino y muestra una completa eliminación en orina y heces (superior al 80 %) (Emmerson and Anderson, 1966). También se observan bajos niveles de residuos en tejido mediante la administración de trifluralin vía peroral en ratas (Golab *et al.*, 1969; Erkog & Menzer, 1985). Con un incremento de la dosis, la proporción de trifluralin y metabolitos excretados en las heces aumenta, indicando una saturación de la absorción de trifluralin y del sistema urinario (Erkog & Menzer, 1985). Mientras que la mayoría de los metabolitos no identificados de trifluralin son compuestos polares, el principal metabolito identificado en heces resultó provenir de la reducción de un grupo nitro, y en orina de la nitro reducción y de N-desalquilación (Emmerson & Anderson, 1966; Golab *et al.*, 1969). *In vitro* la vía metabólica predominante es la de la hidroxilación alifática y la desalquilación (Nelson *et al.*, 1977). Sin embargo, el número de metabolitos y la significancia de varias de las rutas varía con el tamaño de la dosis. Se han publicado además reacciones de conjugación, así como la producción continua de desalquilación y reacciones de ciclización (Nelson *et al.*, 1977; Erkog & Menzner, 1985).

La administración parenteral demostró que debido a su alta lipofilia el trifluralin y sus metabolitos se acumulan en grasa (Emmerson & Anderson, 1996; Golab *et al.*, 1969).

Heck *et al* (1977) encontraron bajas concentraciones de trifluralin en plasma y un importante depósito en tejidos. La vía de administración peroral en ratas

presentó una pequeña absorción de la droga en forma inalterada, mientras que cuando fue administrada parenteralmente, una vez que se absorbe, es decir que llega al torrente circulatorio, el trifluralin y sus metabolitos pueden persistir en grasa por un largo período de tiempo.

Toxicidad:

Dado el amplio uso de trifluralin como herbicida, la toxicología del trifluralin ha sido estudiada ampliamente y revisada (Robens, 1980, Ebert *et al.*, 1992; Byrd *et al.*, 1995). El trifluralin tiene una baja toxicidad en ratas, ratones y perros con una dosis letal evaluada de aproximadamente 2,5 y 10 g/kg respectivamente (Ebert *et al.*, 1992). Sin embargo la edad es un importante factor, con una administración oral en ratas de 1 a 2 días de edad la DL₅₀ es de 0,5 gramos/kg, mientras que en ratas de 49 a 56 días la dosis DL₅₀ es de 36,5 gramos/kg (Goldenthal, 1971). Los efectos adversos observados en rata y ratón incluyeron alteraciones de la actividad motriz, decaimiento, erección pilosa, posición abdominal, pasividad, temblor, midriasis, exoftalmia e incremento de la secreción lacrimal (Ebert *et al.*, 1992; Byrd *et al.*, 1995). En estudios subcrónicos se observó una pérdida del peso corporal, una disminución del consumo de alimento y alopecia (Byrd *et al.*, 1995), tampoco se observaron efectos de toxicidad con respecto a controles normales cuando administraron trifluralin vía peroral (50 mg/kg/día) en ratones. El principal órgano blanco para la toxicidad de trifluralin son las células del tejido hematopoyético y en menor grado el hígado, con una reversibilidad en un período recuperación de dos semanas (Ebert *et al.*, 1992).

DESARROLLO DE PREPARADOS DE TRIFLURALIN

La biodisponibilidad de drogas poco solubles, como es el caso de la trifluralin, puede ser incrementada empleando formulaciones basadas en lípidos. Muchos trabajos se han realizado en las últimas décadas para el desarrollo de sistemas de liberación de drogas basados en la nanotecnología. Entre ellos, los liposomas son unos de los mejores caracterizados. Aunque los liposomas fueron descritos por Bangham en el año 1960, recién a comienzos de 1990 comenzaron a proponerse como sistemas de liberación de drogas. Desde ese momento, han sido empleados como vehículos de una amplia variedad de drogas, dando como resultados un incremento de sus índices terapéuticos (Cruz *et al.*, 2005). Sus propiedades multifuncionales juegan un rol clave modificando el perfil de biodisponibilidad del agente terapéutico.

La transformación de una droga libre en su formulación liposomal es una estrategia que también sirve para controlar y modificar la farmacocinética y biodistribución. Luego del encapsulamiento, ambos parámetros pasan a depender de las propiedades fisicoquímicas del sistema liposoma-droga. Es por esto que la elección de liposomas uni o multilamelares, liposomas grandes o pequeños, composición lipídica, permite ejercer un control sobre las propiedades de la droga. Estos hechos, acompañados por la disminución en la toxicidad de los liposomas cargados con la droga en comparación con la droga libre, alientan a intentar desarrollar un sistema de encapsulamiento de trifluralin en liposomas.

Los liposomas, formados por fosfolípidos dispersos en agua los que se autoorganizan en bicapas esféricas concéntricas. Estos liposomas, se denominan liposomas multilamelares (MLVs), que pueden reducirse en tamaño y lamelalidad por pasaje a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro definido, obteniendo vesículas unilamelares grandes (LUVs), o por ultrasonido, obteniendo de esta manera vesículas unilamelares pequeñas (SUVs).

El éxito del empleo de liposomas en la vehiculización de drogas depende de poder controlar su biodisponibilidad. Cuando el principal objetivo es liberar la droga a macrófagos o monocitos, los liposomas multilamelares grandes son los más efectivos, pero si el objetivo es permitir que la droga alcance un tejido diferente a estas células fagocíticas, existen tres factores a tener en cuenta: la afinidad de los liposomas por las células fagocíticas, la capacidad de los liposomas de escapar al espacio extravascular y por último la afinidad y especificidad de los liposomas por el tejido "blanco" (Gregoriadis and Seniors, 1982).

Para alcanzar el espacio extravascular, los liposomas deben trasladarse a través de las paredes continuas y fenestradas de los capilares, constituyendo esto un problema a afrontar al idear estrategias de liberación de drogas empleando liposomas como vehículo.

Diferencias cuantitativas en la adsorción de proteínas entre los diferentes liposomas, las que resultan de las diferencias de curvatura entre cada uno de ellos, pueden ser responsables de direccionar a las vesículas a diferentes pools.

Cuando los liposomas son inyectados, ocurren una serie de fenómenos, que comienzan con la rápida adsorción de proteínas sobre la superficie de los liposomas. Por un lado, las opsoninas, responsables del reconocimiento de los liposomas por células fagocíticas (Hiroshi, 1997) y lipoproteínas (Maurer *et al.* 2001). En el caso de HDL, estas contienen apolipoproteína intercambiables A, C y E, cuya interacción con la membrana liposomal provoca una desestabilización del liposoma (Rodríguez and Phillips, 1998).

En relación a disminuir la ruta fagocítica, lo más exitoso ha sido el empleo de SUV compuestos de mezclas esfingomielina y colesterol (SM/CHOL) (Hwang *et al.*, 1987). El tiempo de vida en circulación de estos dos tipos de liposomas puede ser de 15 a 20 h, siendo por estos los mejores candidatos en el targeting de drogas in vivo.

Además, es necesario tener en cuenta la dosis de liposomas empleada, ya que a altas dosis, domina una ruta no saturable, mientras que las células de Kupffer participan en la ruta saturable vía fagocitosis predominante a bajas concentraciones de liposomas.

Los liposomas compuestos de mezclas de fosfolípidos (liposomas convencionales) fueron la primera generación de liposomas empleados en el encapsulamiento de drogas. Luego aparecieron liposomas cuya superficie estaba modificada con gangliosidos o ácido sialico, evadiendo el sistema inmune responsable de su eliminación de circulación. Con la misma intención, fueron desarrollados liposomas pegilados (PEG liposomas), denominado "stealth

liposomes" con un elevado tiempo de vida en circulación y una favorable farmacocinética (Cattel *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009).

Por último, con la finalidad de dirigir una droga encapsulada a un tipo celular en particular, se han unido a la superficie del liposoma anticuerpos específicos del blanco en cuestión. La unión de anticuerpos antimiosina a liposomas fue ensayada como una estrategia para dirigir ATP encapsulado en liposomas a tejido miocárdico (Levchenko *et al.*, 2010).

El encapsulamiento de una droga y su direccionamiento en liposomas se considera efectivo si la droga encapsulada es liberada en el sitio deseado. La liberación de la droga está influenciada por la composición de la membrana y de la droga en cuestión. Además, existen en el medio factores que disparan la liberación de la droga, tales como bajos pH y presencia de enzimas particulares, o estímulos como temperatura o ultrasonido los que han ganado atención desde el punto de vista clínico Lindner and Hossann (2010).

Existen en la literatura antecedentes del encapsulamiento de trifluralin en liposomas compuestos de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilglicerol (PG), para su empleo en el tratamiento de leishmaniasis (Marques *et al.*, 2008). En esta enfermedad, el agente infeccioso está localizado en células del sistema fagocítico mononuclear, las que a su vez son el blanco natural de los liposomas.

El objetivo del presente desarrollo de formulaciones con trifluralin será encapsular la droga en liposomas, que escape al sistema fagocítico y con larga vida en circulación y realizar formulaciones de trifluralin preparadas en solución alcohólica y aceite de maní que permitan ser administradas vía endovenosa e intramuscular, respectivamente.

Metodología

El primer paso en la preparación de una formulación liposomal de trifluralin consiste en realizar pruebas *in vitro* con liposomas de diferente composición lipídica, capaces de obtener las mayores relaciones droga/lípido.

Lípidos

Fosfatidilcolina de huevo (PCegg), Fosfatidilcolina hidrogenada (HSPC), Diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), Cholesterol(Chol) esfingomielina (SM).

Se incluirá en la mezcla lipídica Distearolyphosphatidyl ethanolamine-N-poly (ethylene glycol) 2000 (DSPE-PEG 2000) para crear una barrera estérica en los liposomas.

Preparación de Liposomas

MLVs, LUVs y SUVs se prepararán a una concentración de 100 mg/mL.

Los lípidos puros, o sus mezclas y trifluralin en una relación molar 1:10 se solubilizan en cloroformo/metanol 9: 1(vol: vol). El solvente orgánico se evapora bajo corriente de nitrógeno. La película obtenida se solubiliza en ter butanol y se liofiliza toda la noche. Finalmente el liofilizado se rehidrata en buffer salino

(Buffer A, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, pH 7.4, HEPES- salino), esterilizado por filtración. Estas preparaciones se someterán a vortex vigoroso y luego se dejarán toda la noche a 4°C obteniéndose MLVs. Para generar LUVs, MLVs se pasaran a través de membranas de policarbonato (100-nm pore size), proceso denominado extrusión. Los SUV se generarán sometiendo la suspensión de MLVS a 3 ciclos de 20 minutos de sonicación bajo atmosfera de nitrógeno (en un sonicador de punta, potencia 3 Branson. La suspensión inicialmente lechosa, se torna traslúcida. Luego de la sonicación, la suspensión se centrifuga a 20000 rpm 30 minutos para eliminar las partículas de titanio desprendidas de la sonda durante la sonicación.

La concentración de lípidos de las preparaciones se determinara por un microensayo colorimétrico (Botcher *et al.*, 1961). Antes de la inyección las dispersiones se diluyen con buffer estéril a una concentración de 100 mg PL/ ml.

Separación del material no encapsulado

Trifluralin no encapsulado en MLVs sera eliminado por cromatografía de exclusión molecular empleando Sephadex G 50. Los liposomas obtenidos luego de la elución se concentrarán por centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos.

En el caso de SUVs o LUVs, el material no encapsulado se eliminara por cromatografía de exclusión en columna empleando Sephadex G50. Los liposomas obtenidos luego de la extrusión se concentrarán por ultracentrifugación a 70000 rpm durante 3 horas

Las preparaciones de vesículas SUVs y LUVs, se esterilizaran por pasajes a través de filtros de 0.45- μ m antes de la inyección.

Determinación de tamaño

El diámetro de las vesículas se determinará por medidas de dispersión dinámica empleando un Zeta Sizer (Malvern Instruments), obteniendo el diámetro medio de las partículas y la distribución de tamaños en la dispersión.

Eficiencia de encapsulamiento

Trifluralin encapsulado se determinará luego de romper los liposomas con DMSO (1:10, v/v) o TX 100 10 % y cuantificado por HPLC uv (Zaidenbert *et al.*, 2009).

La eficiencia de encapsulamiento se expresará como $\frac{[\text{trifluralin/L}]_{\text{final}}}{[\text{trifluralin/L}]_{\text{inicial}}}$.

Grado de Oponización

La cantidad de proteínas asociadas a las diferentes formulaciones liposomales serán medidas por el método de flotación empleando Nicodenz (Kelley and Kruski, 1986). Luego de la incubación de 100 μ l de la suspensión liposomal con 250 μ l de plasma humano durante 1 h a 37 °c, las mezclas se diluyen con solución isotónica de Nonidenz. Los tubos se ultracentrifugan 15,000 rpm 1h

(rotor SW40). Los liposomas se colectan de la interfase entre la fase Nonidenz y la fase superior acuosa. Los lípidos liposomales se determinarán luego de la extracción y las proteínas serán determinadas por el microensayo de Bradford (1976).

Asociación de lipoproteínas a liposomas

La separación de lipoproteínas se realizará según Cassidy et al., 1998 (Cassidy et al., 1998). Luego de incubar liposomas-trifluralin o liposomas control en plasma durante 15 min a 37°C, se incrementará la densidad del sistema a 1.25 g/ml por agregado de KBr sólido y 3 ml de esta mezcla se cargarán en el fondo de un tubo de centrifuga (Beckman Instruments, CA, US) cubriéndolo con 3 capas de 2.8 ml de 3 soluciones de KBr de diferentes densidades (densidad= 1.21, 1.063 y 1.006 g/ml). Los tubos se ultracentrifugarán en un rotor SW 40 Ti a 40,000 rpm durante 18 h a 15°C en una ultracentrífuga Beckman XL-70. Luego se colectan fracciones de 0.5 ml y se realizara una cuantificación de proteínas según Bradford (1976) y el contenido de fosfolípidos por un método colorimétrico (Botcher et al., 1961).

Estabilidad y liberación de droga *in vitro*: Ensayos de dilución

Con la finalidad de predecir el grado de asociación de la droga al liposoma luego de ser inyectado, se realizaron ensayos de dilución de acuerdo a Barenholz and Amselem (1993). Para esto, 10 µl de la suspensión liposomal se diluirá en buffer 450 veces. Luego de incubar diferentes tiempos (10, 10, 20 y 60 minutos) los tubos se centrifugaran a 14000 rpm durante 10 minutos y se determinará la relación droga/lípido en el pellet.

Preparación de trifluralin libre

Se prepararán soluciones de trifluralin en etanol (TE) (7 gramos/c.s.p. 100 ml de etanol) para la vía endovenosa y trifluralin en aceite de maní (TAM) para su administración por vía intramuscular (Zaidenberg et al., 2009).

Estudio cinético

Animales: Se utilizarán 12 conejos (de la raza/especie Nueva Zelanda), machos, sanos y con pesos corporales (rango) de 1.5 a 2.0 kg en tres experimentos (E1, E2, E3).

Vías de administración y dosis

Las soluciones de trifluralin serán administradas vía endovenosa (TE) (E1), intramuscular (TAM) (E2) y endovenosa conteniendo trifluralin con liposomas (TCL) (E3) en dosis de 50 mg/kg de peso a todos los animales (considerando la dosis utilizada en ratones por Zaidenberg et al., 2009). El momento de la administración para cada una de las vías de administración y soluciones del

trifluralin será determinado utilizando métodos aleatorios, dejando transcurrir 100 vidas medias entre la administración de un preparado y otro.

Tomas de muestras sanguíneas.

Posteriormente de la administración del trifluralin se recogerán muestras sanguíneas a las 0, 0.08, 0.17, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 36.0 y 48.0 horas. Se dejarán transcurrir dos semanas entre una administración y otra.

Cuantificación del trifluralin

La cuantificación del trifluralin en sangre será realizada inmediatamente después del muestreo, utilizando métodos cromatográficos (HPLC) (Zaidenberg *et al.*, 2009).

Se validará la técnica con los parámetros clásicos de linealidad, reproducibilidad, recuperabilidad, límite de detección y de cuantificación.

Análisis cinético y estadístico.

El comportamiento cinético del trifluralin será descrito utilizando modelos compartimentales y no compartimentales (Gibaldi, 1991).

Los criterios utilizados a la hora de elegir el modelo farmacocinético compartimental al que mejor se ajustarán los datos obtenidos experimentalmente serán: el criterio de Akaike (AIC), el criterio de disminución del sumatorio de los residuales al cuadrado ($\sum \text{res}^2$) y la aleatoriedad en la distribución de residuales.

Los resultados de las variables cinéticas de trifluralin administrado por distintas vías serán comparados estadísticamente teniendo en cuenta la siguiente premisa: si la distribución es normal se realizarán métodos paramétricos, caso contrario se utilizarán métodos no paramétricos. El estudio estadístico se llevará a cabo utilizando el programa informático Statistica 7.

ESTUDIO CINETICO MULTIDOSIS EN BASE A UN REGIMEN DE TREINTA DIAS DE TRATAMIENTO.

Animales. Se seguirá la misma premisa utilizada para el estudio realizado en la cinética de trifluralin administrado en monodosis. Las muestras de sangre serán tomadas previo a la administración de la droga y a los 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 24 horas del primer día. En los restantes veintinueve días se tomarán muestras a las 3, 6, 12 y 24 horas posteriores a cada una de las administraciones. En el trigésimo día se tomarán muestras sanguíneas a todos los animales a los mismos tiempos que en el día uno, continuando el muestreo cada 24 horas durante siete días.

Las muestras serán procesadas para su cuantificación y evaluadas en igual forma que para el estudio cinético monodosis.

- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

- Revisión y actualización periódica de bibliografía.

- Selección de animales, evaluación clínica, acondicionamiento de lugar de alojamiento e identificación.
- Desarrollo de preparados de trifluralin
- Tomas de muestras para estudios farmacocinéticos de trifluralin administrado en regímenes terapéuticos de dosis única.
- Tomas de muestras para estudios farmacocinéticos de trifluralin administrado en regímenes de dosis múltiples.
- Cuantificación de trifluralin mediante técnica de HPLC/uv
- Estudio farmacocinético y estadístico.
- Discusión de los resultados y elaboración de conclusiones
- Realización de informes y memorias parciales.
- Divulgación de resultados.

Bimestres	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Revisión Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Desarrollo de preparados de trifluralin	X	X	X						
Cuantificación de trifluralin			X	X	X	X	X		
Toma de muestras			X	X	X	X	X		
Análisis farmacocinético y estadístico				X	X	X	X	X	
Discusión Resultados								X	X
Elaboración informes								X	X
Divulgación							X	X	X

- BIBLIOGRAFÍA

Agbedahunsi JM, Anao I, Adewunmi CO and Croft SL. Trypanosidal properties of *Termanalia ivorensis* A. Chev. (Combretaceae). African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2006; 3(2):51-6.

Ambrozin ARP, Vieira PC, Fernández JB, Fernandes da Silva MFG, Albuquerque S. (2004). Trypanosidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extract. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99, No. 2, March, PP. 227-31.

Atawodi SE, Bulus T, Ibrahim S, Ameh DA, Nok A J, Mamman M, Galadima M. In vitro trypanocidal effect of methanolic extract of some Nigerian savannah plants.. African Journal of Biotechnology. 2003; 2 (9):317-21.

Bangham AD. Model Membranes. Chem Phys Lipids. 1972; 8(4):386-92.

Barenholz Y, Amselem S. Liposome preparation and related techniques. Gregoriadis G (eds); Liposome Technology CRC Press: Boca Ratón, 1993, pp 527-616.

Botcher CJF, Van Gent CM, Pries C. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. Anal Chim Acta. 1961;24:203-4.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72:248-54.

Budavari S. (1989). The Merck Index. Merck and Co., Inc., Rahway, N. J., USA.

Byrd RA, Markham JK and Emmerson JL Developmental toxicity of dinitroaniline herbicides in rats and rabbits I. Trifluralin. Fundamental and Applied Toxicology. 1995; 26:181-90.

Camargo ME, Hshino S, Sequeira GRV. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serological of American Trypanosomiasis. Rev Inst Med Trop Sao Pablo. 1973; 15:81-5.

Campos FR, Junúario AH, Rosas LV, Nascimento SKR, Pereira PS, França SC, Cordeiro MSC, Toldo MP and Albuquerque S. Trypanosidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. Fitoterapia. 2005; 76(1):26-29.

Cassidy SM, Strobel FW, Wasan KM. Plasma lipoprotein distribution of liposomal nystatin is influenced by protein content of high-density lipoproteins. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42:1878-88.

Cattel L, Ceruti M, Dosio F. From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. Tumori. 2003; 89(3):237-49.

Chan MM, Tzeng J, Emge TJ, and Ho Ch. Structure-function analysis of antimicrotubule dinitroanilines against Promastigotes of the Parasitic Protozoan *Leishmania mexicana*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993; 37(9):1909-13.

Chan MM, Gragl M, Callahan H, and Fong D. Efficacy of the Herbicide Trifluralin four – Glycoprotein- Expressing Strains of *Leishmania*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995; 39(7):1609-11.

Croft SL, Snowdon D, Yardley V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 38:1041-7.

Croft SL. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. *Mem. Inst.* 1999; 94:215-20

Croft SL, Seifertm K and Duchêne M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2003; 126(2):165-72.

Cruz ME, Manuela Gaspar M, Bárbara M, Martins F, Luísa Corvo M. *Methods Enzymol.* 2005; 391:395-413.

De Souza W Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* 1984; 86:197-283.

Docampo R, Moreno SNJ. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against *Trypanosomatid* and *Apicomplexan* parasites. *Curr. Drug Targets-Infec. Disord.* 201; 1:51-61.

Dow GS, Armson A, Boddy MR, Itenge T, McCarthy D, Parkin JE. *Plasmodium*: assessment of the antimalarial potential of trifluralin and related compounds using a rat model of malaria, *Rattus norvegicus*. *Experimental Parasitology* 2002; 100:155-60.

Ebert E, Leist KH, Hack R, and Ehling G. Toxicology and hazard potential of trifluralin. *Food and Chemical Toxicology.* 1992, 30(12):1031-44.

Emmerson JL, Anderson RC. Metabolism of trifluralin in the rat and dog. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1966; 30:1031-44.

Erkog FU, Menzer RE. Metabolism of trifluralin in rats. *J Agric Food Chem.* 1985; 33:1061-70.

Fidalgo LM, Ramos IS, Montalvo Alvares AM, Lorente NG, Lizama RS and Payrol JA. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. *Rev. Cubana Med. Trop.* 2004;56 (3):230-3.

^a Garzoni, LR, Caldera A, Meirelles, MNL, de Castro SL, Docampo R, Meints GA, Oldfield E, Urbina JA. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Intern. J. Antimicrob. Agents.* 2004; 23:273-85.

^b Garzoni, LR, Waghbi MC, Baptista MM, Castro de SL, Meirelles MNL, Britto C, Docampo R, Oldfield E, Urbina JA. Antiparasitic activity of risedronate in a

murine model of acute Chagas' disease., Intern. J. Antimicrob. Agents 2004; 23:286-90.

Gibaldi M, Perrier D. (1982). Pharmacokinetics. In: Multicompartment Models. Marcel Dekker editor. 2nd edn. New York. 47-98.

Golab T, Hergerg RJ, Day EW, Raun AP, Holzer FJ, and Probst GW. Fate of carbon- 14 trifluralin in artificial rumen fluid and in ruminant animals. Journal of Agricultural Food and Chemistry. 1969; 17(3):576-80.

Goldenthal E I. A compilation od LD50 values in newborn and adult animals. Toxicology and Applied Pharmacology. 1971; 18: 185-207.

Grael CFF, Albuquerque S, Lopes JLC. Chemical constituents of *Lychnophora pohl* and trypanosidal activity of crude plant extracts. *Fitoterapia*. 2005; 76:73-82.

Gregoriadis G, Senior J. Control of fate and behaviour of liposomes in vivo. *Prog Clin Biol Res*. 1982; 102(A):263-79.

Hiroshi K. Plasma factors affecting disposition of liposomes. *ADD*. 1997; 24:193-9.

Heatley JJ. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice*. Cardiology., Vol 12, No. 1, pp 136-144, January 2009.

Heck HA, Yer RL, Scott AC, and An bar M. Determination and disposition of trifluralin in the rat. Separaton by sequential high-pressure liquid chromatography and quantitation by field ionisation mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 1977; 25(4):901-8.

Helling CS. Dinitroaniline herbicides in soils. *Journal of Environmental Qualrty*. 1976; 5(1):1-15.

Hess D, and Bayer D. The effect of trifluralin on the ultrastructure of diving cells of the root meristem of cotton (*Gossypium hirsutum* L 'ACALA 4-42'). *J. Cell Sci*. 1974; 15:429-41.

Hocquemiller R, Cortes D, Arango GJ, Myint SH, Cavé A. Isoelement et synthese de l'espintanol, nouveau montnoterpene antiparasitaire. *Journal of natural Products*. 1991; 54(2):445-52.

Kelley JL and Kruski AW. Density gradient ultracentrifugation of serum lipoproteins in a swinging bucket rotor. *Methods Enzymol*. 1986; 128:170-81.

Kim JY, Kim JK, Park JS, Byun Y, Kim CK. The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. *Biomaterials*. 2009; 30(29):5751-6.

Letis E, and Crosby DG. Photodescomposition of trifluralin. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 1974; 22 (5):842-8.

Levchenko TS, Hartner WC, Verma DD, Bernstein EA, Torchilin VP. ATP-loaded liposomes for targeted treatment in models of myocardial ischemia. *Methods Mol Biol*. 2010; 605:361-75.

Lindner LH, Hossann M. Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2010;13(1):111-23.

Marques C, Carneiro M, Pereira MA, Jorge J, Cruz ME, Santos-Gomes GM. Efficacy of the liposome trifluralin in the treatment of experimental canine leishmaniasis. *Vet J*. 2008; 178(1):133-7.

Marra CA, Zaidenberg A, de Alaniz MJ, Buschiazzi H. The restoring effect of trifluralin and benznidazole on the abnormal fatty-acid pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in the liver microsomes of infected mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002; 96(3):249-64.

Maurer N, Fenske DB, Cullis PR. Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin Biol Ther*. 2001; 9:23-47.

Nelson JO, Kearney, PC, Plinmer JR, and Menzner RE. Metabolism of trifluralin, profluralin and fluchloralin by rat liver microsomes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1977; 7:73-82.

Pan, SC. Cultivation of the leishmaniform stage of *Trypanosoma cruzi* in cell free media at different temperature. *Am.J. Trop.Med.Hyg*. 1968; 17:823-32.

Pereira S, Dias, DA, Sampaio SV., França, SC, Toldo, MPA and Albuquerque, S. Trypanocidal Activity from *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Acta Hort. (ISHS)*. 1999; 501:165-70.

Potáčová A, Adamcová M, Čajnáková H, Hrbatová I, Štěrbá M, Popelová o, Šmúnek T, Poňka P, Geršl V. Evaluation of ECG Time Intervals in a Rabbit Model of Anthracycline-Induced Cardiomyopathy: A Useful Tool for Assessment of Cardioprotective Agents. *Physiol. Res* 2007; 56:251-25.

Prosbt GW, Golab T, Herberg FJ, Parka SJ, van der Schans C, and Tepe JB. Fate of trifluralin in soils and plants. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 1967; 15 (4):592- 9.

Robens JF. Carcinogenicity studies of selected herbicides. *Veterinary and Human Toxicology*. 1980; 22:328-34.

Rodriguez W, Phillips M, Williams K. Structural and metabolic consequences of liposome-lipoprotein interactions. *Adv Drug Deliv Reviews*. 1998; 32:31-43.

Schinella GR, Tournier H, Orieto JM, Rios J, Buschiazzi H, Zaidenberg A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. *Fitoterapia*. 2002; 73:569-75.

Schofield CJ and Maudlin I. Trypanosomiasis control. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31 (5-6):614-619.

Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases .TDR (2005) | Seventeenth Programme Report | Progress (2003-2004).

Sepúlveda-Boza S and Cassels BK. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi* *Planta Med.* 1996; 62:98-105.

Sosa-Estani S, Armenti J., Araujo G, Viotti R, Lococo B, Ruiz Vera B, Vigliano C, De Rissio AM, Segura EL. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol y ácido tioctico. *Medicina (Buenos Aires)*. 2004; 64:1-6

Stopani, AOM. Quimioterapia de la Enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*. 1999; 59 (Supl. II):147-65.

Tepe JB, and Scroggs RE, (1967). Trifluralin. Analytical methods for pesticides plant growth regulators and food additives. (Zweig G, Ed), pp 527-35. Academic Press, New York.

Tomlin C. (1994). *The Pesticide Manual*, 10th ed., Corp Protection Publications.

Traub-Cseko YJ, Ramalho-Ortigado M, Dantas AP, Castro de SL, Barbosa HS and Downing K H. Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: the case of *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*. 2001; 17(3):136-41.

Urbina, JA. (1999). Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94 (1): 349-354. A genomic approach to study.

Weber JB, and Monaco TJ. Review of the chemical and physical properties of the substituted dinitroaniline herbicides. *Proceedings, Southern Weed Science Society*. 1972; 25:31-7.

Wurochekke AU, Chechet G and Nok AJ. In Vitro and in vivo anti trypanosomal activity of the leaf or *Lasonia iermis* against *Trypanosoma brucei brucei* infection in mice. *J. Med. Sci.* 2004; 4(3):236-9.

Zaidenberg A, Marra C, Villagra S, **Rule R.** Pharmacokinetics of trifluralin in blood and heart tissue of mice. *Chemotherapy*. 2009; 55(5):327-34.

PLAN DE TRABAJO PERIODO 2012-2014

Evaluación del comportamiento cinético de una formulación de ceftazidima administrada en cabras con producción lechera.

Introducción

La ceftazidima es una cefalosporina de tercera generación que presenta actividad contra *E. coli*, *C. diversus*, *C. Freundii*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp*, *Klebsiela spp*, *S. Marcescens*, *Salmonellas*, *Shigellas* y *P. aeruginosa*. En general, para todos los microorganismos enunciados la concentración inhibitoria mínima (CIM) no supera los 4 µg/ml (O'Callaghan *et al.*, 1980; Thornsberry, 1985). La actividad antibacteriana de la ceftazidima está determinada por el tiempo por el cual las concentraciones del fármaco en sangre y leche permanecen por encima de la CIM.

La ceftazidima fue utilizada por Rule *et al.* (1998) para tratamientos en vacas lecheras (administrada vía intramamaria, en tres dosis de 200 mg/cuarto y cada 12 horas) con signos clínicos de inflamación y presencia de uno o mas microorganismos patógenos en las glándulas mamarias. En líneas generales la ceftazidima administrada a vacas en producción lechera presentó buena distribución en glándula mamaria y presencia de residuos durante 72 horas posteriores a su administración debiéndose descartar la leche para consumo humano durante ese tiempo (Rule *et al.*, 1998).

Blanco *et al* (1983) observaron que la baja unión a proteínas permite la difusión de la ceftazidima a glándula mamaria. La ceftazidima tiene uniones a proteínas que pueden variar con la especie animal y que van del 20 al 30 % en ratones y ratas (O'Callaghan *et al.*, 1980), 10 % en humanos (Blanco *et al.*, 1983) y 17 % en conejos (Abd El-Aty *et al.*, 2001). En tanto, Lam *et al.* (1988) encontraron que la actividad bactericida de ceftazidima estaba más estrechamente relacionado al fármaco no unido que a las concentraciones totales de antibióticos y que sólo el fármaco libre es microbiológicamente activo.

La ceftazidima administradas en perros vía subcutánea ó intramuscular (25 mg/kg de peso) pueden resultar efectiva contra *P. aeruginosa* (Monfrinotti *et al.*, 2009). Abd El-Aty (2001) recomiendan para el tratamiento de gérmenes sensibles en conejos administrar una dosis de 50 mg/kg de peso por vía intramuscular cada 12 horas.

Aunque Rule *et al.* (2011) y Abo-El-Sooud y Tohamy (2011) realizaron estudios sobre el comportamiento farmacocinético de ceftazidima, preparada en soluciones acuosas, en cabras con y sin producción lechera y cabras en producción lechera sanas y mastíticas, respectivamente, se desconoce el comportamiento de dicho antibiótico en cabras en lactación cuando se utilizan otros excipientes.

Los objetivos del presente plan de trabajo son determinar el comportamiento farmacocinético en suero y lechera de una formulación de ceftazidima administrada en cabras con producción lechera.

Materiales y métodos

Animales. Seis cabras criollas sanas con producción láctea serán utilizadas en los grupos 1 (G1) y 2 (G2).

Grupo 1. A los animales del G1 se les administrara vía intramuscular una monodosis de ceftazidima de Laboratorio Klonal (20 mg/kg).

Grupo 2. Pasados 15 días de la administración en el G1 a los mismos animales se les administrará ceftazidima (preparado en una formulación de larga acción) vía intramuscular (20 mg/kg).

Toma de muestras. Las tomas de muestras sanguíneas y lácteas para cuantificar el antibiótico se realizaran previa y posteriormente a las administraciones del antibiótico (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas).

Cuantificación y análisis cinético del antibiótico: Las concentraciones-tiempo de ceftazidima serán determinadas utilizando un método biológico (Gin *et al.*, 1982) y analizadas no compartimentalmente con el programa WinNonlin (V.4.1 Pharsight Corp., Cary, NC).

Análisis estadístico: Se empleara el programa informático de estadística Statgraphics Plus.

Bibliografía

Abd El-Aty AM, Goudah A, Abo El-Sooud K 2001 Pharmacokinetics, intramuscular bioavailability and tissue residue profile of ceftazidime in rabbit model. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108(4):168-71.

Abo-EI-Sooud K and Tohamy MA 2011 Comparativye pharmacokinetics and milk concentrations of ceftazidime in healthy and mastitic goats. *Insight Pharmaceutical Science*, 1(1):11-17.

Blanco JD, Jorgensen JH, Castaneda YS, Crawford SA 1983 Ceftazidime levels in human breast milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(3):479-480.

Gin RE, Case R, Packard VS and Tatini S 1982 Quantitative assay of Beta-lactam residues in raw milk using a disc assay method. *Journal of Food Protection*, 45(6):571-573.

Lam YWF, Duroux MH, Gambertoglio JG, Barriere SL, Guglielmo BJ 1988 Effect of protein binding on serum bactericidal activities of ceftazidime and cefoperazone in healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(3):298-302.

Monfrinotti A, Ambros L, Prados AP, Kreil V, Rebuelto M 2010 Pharmacokinetics of ceftazidime after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33(2):204-207.

O'Callaghan CH, Acred P, Harper PB, Ryan DM, Kirby SM, Harding SM. GR 20263 1980 A new broad-spectrum cephalosporin with anti-pseudomonal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17(5):876-83.

Rule R, Quiroga G, Buschiazzo H, Lacchini R and Mordujovich P 1998 Rate of decline in milk concentrations of cefotaxime and ceftazidime administered by intramammary route in healthy and mastitic dairy cows. *The Veterinary Record*, 12:310-311.

Rule R, Villagra S, Barrena P, Lacchini R, Reynaldi FJ 2011 Pharmacokinetics of ceftazidime administered to lactating and non-lactating goats. *Journal of the South African Veterinary Association*, 82(4):219-223.

Thornsberry C 1985 Review of in vitro activity of third-generation cephalosporins and other newer Beta-lactam antibiotics against clinically important bacteria. *The American Journal of Medicine*, 79(2A):14-20.

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período"
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
 - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.