

Farmacocinética de una formulación de praziquantel administrada por vía transdérmica (*spot on*) en perros

Dra. María Laura Gutiérrez

Dr. Guillermo Di Federico

Dr. Jorge Dale

Dr. Juan Mauricio Minoia

Dra. Paula Susana Schaiquevich

Dra. Silvia Wikinski

Farmacocinética de una formulación de praziquantel administrada por vía transdérmica (*spot on*) en perros

Dra. María Laura Gutiérrez, Dr. Guillermo Di Federico, Dr. Jorge Dale,
Dr. Juan Mauricio Minoia, Dra. Paula Susana Schaiquevich, Dra. Silvia Wikinski*

Resumen

El Praziquantel es un reconocido antihelmíntico empleado en humanos y animales, que puede ser administrado por distintas vías.

A diferencia de lo ocurrido en gatos, no había sido demostrada hasta el momento la absorción transdérmica (*spot on*) del Praziquantel en perros.

En este trabajo se describe el comportamiento plasmático de una formulación de praziquantel (Labyes) luego de aplicarse por vía transdérmica (*spot on*) a 7 (siete) perros adultos mestizos.

Se tomaron como referencia estudios anteriores realizados en gatos.

El presente ensayo es el primero en proporcionar datos farmacocinéticos de una formulación *spot on* de praziquantel luego de ser administrada a perros.

Se puede concluir que los rangos de C_p hallados en este ensayo pueden ser compatibles con antecedentes publicados por otros autores.

Por otra parte, los resultados obtenidos permitieron

respaldar la efectividad antihelmíntica en la luz intestinal, en animales tratados con la formulación ensayada.

Introducción

El praziquantel, derivado sintético de la isoquinolina-pirazina, es un antiparasitario antihelmíntico indicado para el tratamiento de varias especies de trematodos y cestodos que afectan a los animales domésticos. Puede ser administrado por distintas vías: oral y parenteral.

La eficacia de la aplicación transdérmica de praziquantel en gatos está ampliamente demostrada (Jenkins and Romig 2000), pero no se ha logrado hasta el momento demostrar su penetración y efectividad por la misma vía en perros.

Existen en el mercado productos de aplicación transdérmica conteniendo praziquantel en combinación con otras drogas endectocidas con eficacia comprobada en gatos (Traversa et al 2009, Tawee-thavonsawat et al 2013, Böhm et al 2015, Krüdewa-

* Dra. María Laura Gutiérrez, Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Dr. Juan Mauricio Minoia, Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Dra. Paula Susana Schaiquevich, Unidad de Farmacocinética Clínica, Hospital de Pediatría J.P. Garrahan.

Prof. Dra. Silvia Wikinski, Investigadora Independiente-CONICET, Directora del Nodo Preclínicos-EBAL, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina-UBA.

Dr. Guillermo Di Federico: Auxiliar Diplomado. Servicio de Cirugía, Hospital Escuela, Fac Ciencias Veterinarias, UNLP. –

Dr. Jorge Armando Dale: Laboratorio Labyes.

gen 2015). Este antecedente representa un desafío que de lograrse, permitiría combinar el praziquantel con otras drogas del tipo, que aplicadas en conjunto por la misma vía, permitirían abordar de manera simple, práctica y efectiva las diferentes parasitosis que afectan a los perros (en algunos casos enfermedades zoonóticas) y que requieren de un manejo estricto y sistemático.

Es importante tener en cuenta que existen diferencias fisiológicas significativas entre gatos y perros, que deben necesariamente ser consideradas al momento de desarrollar un producto con iguales fines terapéuticos. Las características histológicas de la barrera cutánea del perro comparadas con las del gato, explican gran parte de la dificultad de lograr una penetración efectiva similar en ambas especies.

Variables como el flujo sanguíneo, densidad capilar, estructura e índice de crecimiento del manto piloso, cantidad y disposición de glándulas sebáceas y sudoríparas y principalmente, el espesor de la piel (alrededor de $21,16 \pm 2,55 \mu\text{m}$ en perros versus $12,97 \pm 0,93 \mu\text{m}$ en gatos) influyen considerablemente en la absorción de determinadas drogas, y se vuelven un desafío a la hora de desarrollar una formulación terapéutica adecuada y segura para cada especie. Un ejemplo de las diferencias fisiológicas mencionadas se evidencia es un estudio comparativo de penetración percutánea de Selamectina (lactona macrocíclica) en el cual se obtuvo una biodisponibilidad farmacológica de 4% en perros, mientras que en gatos la misma fue de un 74%.

La aplicación de fármacos por piel, ofrece muchas ventajas con respecto a la ruta oral permitiendo, entre otras cosas, una administración de forma controlada. El uso de esta vía en perros, brinda facilidad y practicidad, eliminando los riesgos que particularmente representa un perro agresivo durante la administración oral de fármacos, además de evitar fallas por vómitos o rechazo de los comprimidos.

La vía de administración transdérmica ofrece además las siguientes ventajas: evita el efecto de primer paso hepático y mejora por lo tanto la biodisponibilidad, hace posible una administración más controlada y por períodos más prolongados de tiempo que la que ofrece la ruta oral y si fuera conveniente

habilitaría a la formulación de medicamentos compuestos por asociaciones de praziquantel y otros antiparasitarios, con la consiguiente ventaja de lograr una desparasitación más completa con una sola aplicación. Dado que sería de gran utilidad para la clínica veterinaria poder administrar un antiparasitario por vía transdérmica a perros, en el presente estudio nos propusimos estudiar la farmacocinética de una formulación de praziquantel aplicado por vía *spot on* en perros.

Materiales y Métodos

Selección de animales

Se emplearon 7 perros mestizos del Refugio S.A.D.A.C. de la localidad de Quilmes Pcia de Buenos Aires, Argentina, con la debida autorización de su cuidador, con edades comprendidas entre los 2 y 5 años, machos y hembras, con un peso individual de entre 12 y 25 kilos, en buenas condiciones de salud.

Se incluyeron dentro del protocolo de trabajo únicamente aquellos individuos que a la exploración clínica, realizada por un médico veterinario, acusaron un buen estado de salud. Se tuvieron en cuenta el estado nutricional, la condición corporal, la coloración de las mucosas, el tiempo de llenado capilar, la auscultación cardíaca y pulmonar, palpación abdominal y presencia o ausencia de signos compatibles con enfermedad.

Se excluyeron animales gestantes o durante el amamantamiento, con bajo peso para su edad, o con evidencia clínica de estar cursando algún proceso patológico.

Los sujetos experimentales fueron dispuestos individualmente en 7 caniles de acero inoxidable adecuados para tal fin. El régimen de alimentación fue el mismo al que los animales estaban acostumbrados a recibir, consistiendo en dos raciones diarias de alimento balanceado y agua *ad libitum*.

La identificación de los individuos se realizó a partir de la utilización de collares con numeración; de la misma manera los caniles fueron identificados con número según el individuo alojado.

Se confeccionó una ficha clínica para cada animal indicando número de individualización y número del canil en el cual se aloja. En la misma se registraron el

peso, el sexo, la edad aproximada, el pelaje (en términos de corto, mediano o largo), señas particulares, dosificación de la formulación en estudio a aplicar, sus efectos y otras observaciones que pudieran ser de importancia en la interpretación de los resultados.

Tratamientos y colección de muestras

Del total de siete perros empleados en el ensayo, 6 recibieron por vía *spot on*, una dosis de 14,5 mg/kg de una solución de praziquantel de concentración 100 mg/ml. De esta forma, el volumen aplicado a los animales fue de 0,145 ml/kg. La formulación combinó una solución de praziquantel al 10 % en el diluyente del preparado que contiene distintos antioxidantes y un enhancer específico (solvente polar aprótico). El animal 7 no recibió tratamiento, dado que se utilizó como control negativo.

Tabla 1: Pesos y dosis

Individuo	Peso corporal (kg)	Dosis (ml)
Perro 1	17,4	2,52
Perro 2	24,0	3,48
Perro 3	12,7	1,84
Perro 4	25,0	3,62
Perro 5	13,5	1,96
Perro 6	17,6	2,55
Perro 7	16,0	CONTROL NEGATIVO

El producto se aplicó en forma tópica directamente sobre la piel seca de los animales, en la región dorsal del cuello, a la altura de las vértebras cervicales, separando el pelo de tal forma que el producto no produzca derrames apreciables sobre el pelaje. De esta forma se evitó el lamido de los animales sobre la zona tratada.

Se tomaron muestras de 1 ml de sangre a los siguientes tiempos: 1, 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas. Las mismas fueron colocadas en tubos conteniendo anticoagulante EDTA dipotásico. En un plazo no mayor a 2 horas fueron enviadas al laboratorio donde se

separaron los plasmas por centrifugación y luego se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Método para la cuantificación de praziquantel en plasma

La cuantificación plasmática de praziquantel fue realizada por el laboratorio del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA), Argentina. Se utilizó un protocolo previamente validado, en el cual se precipitaron las proteínas plasmáticas constitutivas con acetonitrilo en medio ácido y el sobrenadante se analizó por cromatografía en fase líquida de ultra alto desempeño (UPLC) y se detectó por espectrometría de masas (MS/MS).

Utilizando un detector de tipo doble masa en tándem, se seleccionan en el primer cuádruplo los iones de la fuente de iones en función de su relación masa/carga (m/z). Los iones cuyas relaciones m/c corresponden al del analito de interés pasan a la cámara de colisión donde colisionan con un gas neutro y generan fragmentos iónicos estructuralmente específicos. En la segunda etapa de la espectrometría de masa, estos fragmentos iónicos estructuralmente específicos (normalmente los más abundantes) son conducidos al fotomultiplicador donde generan una señal que es interpretada por el software. La identificación y cuantificación de praziquantel en plasma se realizó a través del espectro de masa de iones producidos, relacionando dicho espectro con su estructura química a partir del ión precursor $(M-H)^+$ (m/z : 313,1).

Validación de la técnica analítica

Con el fin de validar el método de cuantificación de praziquantel en plasma, fueron evaluados los siguientes parámetros: selectividad y efecto residual, recuperación, exactitud (error relativo porcentual menor al 15%), precisión (coeficiente de variación menor al 15%), límites de cuantificación ($\geq 3 \leq 1000$ ng/ml), linealidad (tres curvas con un mínimo de 6 puntos cada una y un R^2 mayor a 0,98), robustez, estabilidad de la muestra a lo largo de ciclos de congelamiento/descongelamiento, estabilidad a corto plazo, condiciones de análisis, conservación autosampler, estabilidad de la solución patrón y estabilidad a largo plazo). Todos los parámetros cumplieron con los criterios de aceptación.

Análisis de datos

A partir de los datos proporcionados por UPLC-MS/MS, se confeccionaron las curvas de concentración plasmática (Cp) en el tiempo y se analizaron los siguientes parámetros farmacocinéticos mediante el software Monolix®: concentración plasmática máxima (Cmax), tiempo en el que se alcanzó la máxima concentración (Tmax), área bajo la curva (AUC) y tiempo vida media (T_{1/2}) para praziquantel en plasma de cada uno de los animales.

Resultados

Se determinó la farmacocinética de praziquantel luego de una única dosis de 14,5 mg/kg, administrado por vía transdérmica en forma de pipeta *spot on*. La Tabla 2 expresa los valores individuales de las concentraciones plasmáticas de praziquantel obtenidas en cada punto para cada sujeto experimental. Los mismos valores se encuentran representados en la figura 1.

Tabla 2: Concentraciones plasmáticas de praziquantel medidas en perros adultos tratados con una única dosis de praziquantel 14,5 mg/kg por vía *spot on*

Tiempo (hs)	Concentración plasmática (ng/ml)						
	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Perro 6	Perro 7*
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	33,6	18,3	47,7	12,6	22,8	28,8	0,0
2	48,9	29,4	58,4	14,1	30,9	38,1	0,0
4	77,6	42,7	68,1	31,0	52,8	48,8	0,0
6	63,7	43,9	57,8	38,6	59,0	40,3	0,0
12	42,4	30,5	35,1	36,4	45,1	19,8	0,0
24	20,2	9,4	13,1	18,5	9,1	6,0	0,0
48	7,0	0,0	6,7	6,7	2,5	3,2	0,0

(*) El perro 7 no recibió tratamiento.

Figura 1: Concentraciones plasmáticas de praziquantel en función del tiempo en 6 perros tratados con una única dosis de 14,5 mg/kg de praziquantel y un perro sin tratamiento (control)

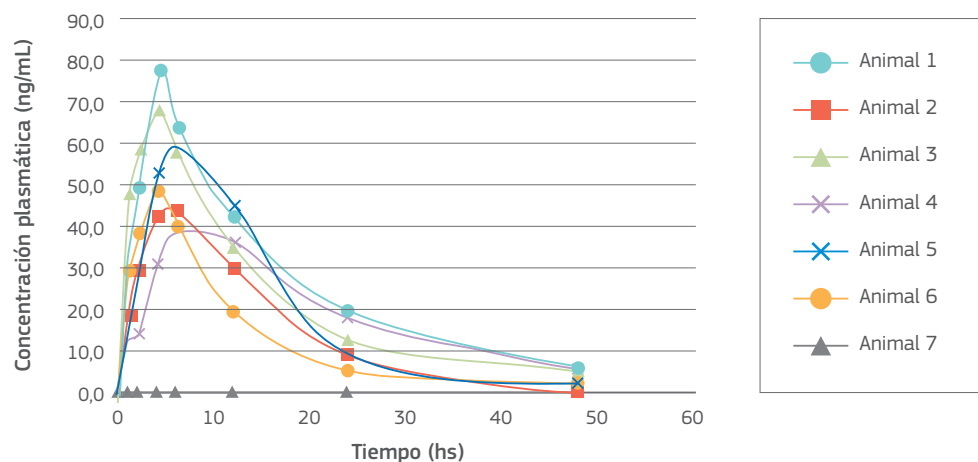
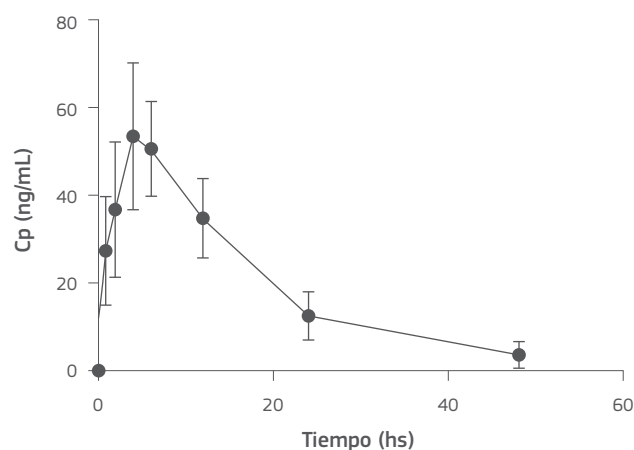


Figura 2: Medianas de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo de animales tratados con una única dosis de 14,5 mg/kg de praziquantel por vía *spot on* (n=6)



Los parámetros farmacocinéticos calculados, se encuentran expresados en la Tabla 3. Puede observarse que la mediana para el AUC_{inf} fue de 996,52 ng h/ml, que la mediana de la $C_{m\acute{a}x}$ fue de 53,9 ng/ml al cabo de 5 horas de la aplicación.

Tabla 3: Parámetros farmacocinéticos de perros adultos tratados con una única dosis de praziquantel 14,5 mg/kg por vía *spot on*

Perro	AUC_{inf} (ng h/ml)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)
1	1321,30	77,6	4
2	731,9	43,9	6
3	1090,58	68,1	4
4	990,89	38,6	6
5	1002,15	59	6
6	626,59	48,8	4
Mediana:	996,52	53,9	5
Máx:	1321,30915	77,6	6
Mín:	626,596885	38,6	4

Discusión

El presente ensayo es el primero en proporcionar datos farmacocinéticos de una formulación *spot on* de praziquantel para ser administrada a perros. Los resultados muestran un $T_{m\acute{a}x}$ de 5 horas con un rango de entre 4 y 6 horas y la existencia de concentraciones plasmáticas detectables hasta las 48 horas con una $C_{m\acute{a}x}$ de 77,6 ng/mL para una dosis administrada de 14,5 mg/kg.

El praziquantel ha sido formulado para su administración *spot on* en productos destinados a gatos y existen en el mercado formulaciones que lo asocian con otros antiparasitarios (Tielemans 2014, Krudewagen 2015, Kvaternik 2014). Según Informes de la European Medicines Agency (EMA), la concentración máxima de una dosis de praziquantel similar a la administrada en este ensayo (0,14 ml/kg) fue de $61,3 \pm 44,1$ ng/ml, lo que entra dentro del rango de los datos hallados por nosotros (EMA, 2008). Por otro lado, el $T_{m\acute{a}x}$ de praziquantel observado en este ensayo es mayor al informado en el resumen emitido por el Committee of Veterinary Medicinal Products para el praziquantel administrado por vía oral a perros, con un pico entre los 30 y los 120 minutos.

Xie y cols (2011). compararon los parámetros farmacocinéticos de una formulación nativa de praziquantel con una nanoparticulada, las dos para ser administradas por vía subcutánea a perros. La dosis administrada en este caso fue de 5 mg/kg, es decir poco más de tres veces menor a la usada en nuestro ensayo. El ensayo de Xie y cols. mostró una $C_{m\acute{a}x}$ de 47,82 ng/mL, con un $T_{m\acute{a}x}$ de 1,45 hora y valores por debajo de 10 ng/ml a las 48 horas, lo que indicaría, como era previsible, que la administración subcutánea proporciona una mayor biodisponibilidad y un menor tiempo a la concentración plasmática máxima.

Por otro lado, Hong y cols (2003) compararon la farmacocinética del praziquantel administrado por vía oral en tabletas convencionales y de liberación prolongada (300 mg) en perros, administradas en una única dosis promedio, considerando el peso de los animales incluidos en el estudio, de 30 mg/kg. Esta dosis, que prácticamente duplica la utilizada en nuestro ensayo produjo una $C_{m\acute{a}x}$ de 10318 ng/0,25 ml (equivalente a 41,27 μ g/ml) para las tabletas de

liberación prolongada y un $C_{\text{máx}}$ de 2476 ng/0,25 ml (equivalente a 9,9 $\mu\text{g/ml}$) para las tabletas convencionales. Estos resultados se encuentran en un orden de magnitud mil veces mayor a lo reportados por Xie y cols. (2011) y a la hallada en este ensayo. Sin embargo, el Tmax obtenido fue 2,25 y 3,2 h para tabletas convencionales y de liberación prolongada respectivamente y a las 12 horas la concentración plasmática fue la mínima detectada.

Al ser esta la primera experiencia de una formulación de praziquantel para ser administrada por vía *spot on* a perros, restaría comprobarse que estos parámetros farmacocinéticos son compatibles con una respuesta clínica adecuada. Lamentablemente, la información acerca de la relación entre niveles plasmáticos de praziquantel y su eficacia antiparasitaria es escasa en general, y directamente nula en perros. Sí se cuenta, sin embargo, con ensayos que compararon la eficacia terapéutica de preparados conteniendo praziquantel administrados por vía oral o por vía *spot on* en gatos, y los resultados resultaron alentadores, lo que dio sustentabilidad a esta vía de

administración en esta especie. Taweethavonsawat y col. (2013) realizaron un estudio comparativo de eficacia en gatos infectados con *Ancylostoma ceylanicum*. Utilizaron dos formulaciones comerciales de praziquantel asociadas a otras drogas, una aplicada por vía *spot on* y otra por vía oral; ambas formulaciones demostraron ser igualmente efectivas contra la infección del parásito en cuestión. Tielemans y col. (2014) demostraron que la combinación de praziquantel con otros antiparasitarios es 100% efectiva para contra *Echinococcus multilocularis* en gatos.

Se puede concluir entonces que los rangos de Cp hallados en este ensayo pueden ser compatibles con antecedentes publicados por otros autores. La mayor velocidad de absorción que garantiza la vía subcutánea, tal como fue informada por Xie y cols. (2011), puede verse compensada con la mayor facilidad de administración que proporciona la vía *spot on*. Es de señalar que a las 48 horas las concentraciones plasmáticas detectadas por una y otra formulación son comparables. ●

Referencias

- Böhm C, Wolken S, Schnyder M, et al. (2015). Efficacy of Emodepside/Praziquantel Spot-on (Profender®) against adult *Aelurostrongylus abstrusus* Nematodes in Experimentally Infected Cats. *Parasitol Res*. 114 Suppl 1:5155-64. doi: 10.1007/s00436-015-4521-0.
- EMEA - European Medicines Evaluation Agency, 1996, Praziquantel: Summary Report (<http://www.ema.europa.eu/docs/en>)
- Hong S-T, Lee SH, Lee S-J, et al. (2003). Sustained-release praziquantel tablet: pharmacokinetics and the treatment of clonorchiasis in beagle dogs. *Parasitol Res* 91: 316–320. DOI 10.1007/s00436-003-0958-7.
- Jenkins DJ, Romig T (2000) Efficacy of Droncit® Spot-on (praziquantel) 4% w/v against immature and mature *Echinococcus multilocularis* in cats. *Int J Parasitol* 30:959–962.
- Krüdewagen EM, Remer C, Deuster K, et al. (2015). Concomitantly Used with Imidacloprid/Moxidectin (Advocate®, Advantage® Multi) and emodepside/Praziquantel (Profender®) Spot-on Formulations. *Parasitol Res* 114 (Suppl 1):S55–S80
- Kvaternicka V, Kellermann M, Knaus M, et al. (2014). Pharmacokinetics and metabolism of eprinomectin in cats when administered in a novel topical combination of fipronil,(S)-methoprene, eprinomectin and praziquantel. *Veterinary Parasitology* 202 : 2–9.
- Monteiro-Riviere et al. (2008). *Dermal Absorption and Toxicity Assessment, Second Edition, Roberts, 2008 – Animal Skin Morphology and Dermal Absorption.*
- Sarasola P, Jernigan AD, Walker DK et al. (2002), Pharmacokinetics of selamectin following intravenous, oral and topical administration in cats and dogs, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 25, 265–272.
- Taweethavonsawat P, Chungpivat S, Watanapongchati S, et al. (2013). Comparative efficacy of a spot-on formulation containing emodepside and praziquantel (Profender®, Bayer) and praziquantel and pyrantel oral tablets (Dronal® for Cats) against experimental *Ancylostoma ceylanicum* infections in cats. *Veterinary Parasitology* 191: 172– 176.
- Tielemans E, Manavella C, Visser M, et al. (2014). Efficacy in cats of a novel topical combination of fipronil,(S)-methoprene, eprinomectin, praziquantel, against induced infestations of *Echinococcus multilocularis*. *Veterinary Parasitology* 202: 26–29.
- Traversa D, Milillo P, Di Cesare A, et al. (2009). Efficacy and safety of emodepside 2.1%/praziquantel 8.6% spot-on formulation in the treatment of feline *aelurostrongylosis*. *Parasitol Res*. 105 Suppl 1:S83-89. doi: 10.1007/s00436-009-1499-5.
- Xie, S., Pan, B., Shi, B., Zhang, Z., Zhang, X., Wang, M., & Zhou, W. (2011). Solid lipid nanoparticle suspension enhanced the therapeutic efficacy of praziquantel against tapeworm, *International Journal of Nanomedicine*, 6,2367-2374. Doi:10.2147/IJN.S24919.

