

AValiação Toxicológica em um novo Anti-helmíntico (LEPURON[®]), de Aplicação Transcutânea, em Bovinos e em Animais de Laboratório.

I. MELITO
A.J. COSTA
G.H. BECHARA

RESUMO

Neste trabalho procurou-se fazer uma avaliação toxicológica de eventuais efeitos colaterais induzidos pelo (-) -2, 3, 5, 6 - Tetrahydro - 6 - phenylimidazo - (2,1 b) thiazole a 20% (LEPURON), aplicado transcutaneamente na região dorso-lombar de animais de laboratório e de bovinos. Os resultados dos testes realizados (inocuidade, DL₅₀, permeabilidade vascular, hematológico, bioquímica do sangue e histopatológico) sugerem que este composto, na dose recomendada para seu uso a nível de campo, é relativamente seguro e isento de efeitos colaterais indesejáveis.

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas de novas formulações anti-helmínticas têm se desenvolvido consideravelmente nos últimos anos, na tentativa de se obter compostos eficazes, de fácil aplicação, baixo custo e pouco tóxicos. Assim, hoje encontram-se disponíveis produtos altamente efetivos contra uma variedade de formas adultas e larvais de parasitos internos dos animais domésticos. Dentre estes compostos pode ser citado o isômero L do Tetramisole (JENSSEN⁴), e que demonstrou ser um eficiente anti-helmíntico (ARMOUR¹), quando aplicado por diferentes vias de administração, além de possuir baixa toxicidade quando aplicado nas formas usuais (ZIPRIN et alii⁶; HSU³; COSTA²).

No presente trabalho procurou-se avaliar eventuais efeitos colaterais induzidos pelo (-) - 2, 3, 5, 6 - Tetrahydro - 6 - phenylimidazo - (2,1 b) thiazole a 20% (LEPURON), numa nova formulação, quando aplicado por via transcutânea na região dorso-lombar de animais de laboratório e de bovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1 - TESTE DE INOCUIDADE

Neste experimento, empregou-se o teste "rough behaviour" (comportamento grosseiro) para a avaliação da substância teste.

Foram utilizados 60 camundongos e 12 cobaias, procedentes do Biotério da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (F.C.A.V.J.) - UNESP, pesando, respectivamente, 18 - 20 gramas e 200 - 300 gramas.

Os camundongos foram divididos em 3 grupos de 20

animais cada, sendo administrados sobre a pele da região dorsal dos mesmos, respectivamente, 5; 250 e 1000 mg/kg, que equivaleriam a 0,5; 25 e 100 vezes a dose proposta para utilização do composto a nível de campo (10 mg/kg), sendo os animais observados durante 7 dias.

Nas cobaias, administrou-se, também sobre a pele, concentrações de 5; 50 e 500 mg/kg, equivalentes a 0,5; 5 e 50 vezes àquela proposta para uso terapêutico.

Experimento 2 - DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL₅₀)

Foram utilizados 20 camundongos procedentes do Biotério da F.C.A.V.J. - UNESP, que foram divididos em 4 grupos de 5 animais cada, nos quais administrou-se sobre a pele doses crescentes em progressão geométrica de 1000; 2000; 4000 e 8000 mg/kg, sendo observados durante 48 horas e anotado o número de animais mortos em cada grupo.

O método utilizado para determinação da DL₅₀ foi o de THOMPSON & WEILL⁵, das médias móveis com interpolação e que utiliza a seguinte fórmula.

$$\log DL_{50} = \log A + d (f + 1)$$

onde:

A = menor dosagem utilizada

d = log da relação entre doses sucessivas

f = constante de interpolação

Experimento 3 - PERMEABILIDADE VASCULAR

Foram utilizados 12 ratos e 6 cobaias procedentes do Bio-

* IMEVE - Indústria de Medicamentos Veterinários Ltda.

tério da F.C.A.V.J. – UNESP, divididos em 2 grupos de 6 ratos e 3 cobaias cada. Os animais foram anestesiados com nembupal (30 mg/kg) intraperitonealmente, sendo cuidadosamente depilados na região dorsal. Através do seio venoso do pênis, foi injetado 0,5 ml de uma solução aquosa a 1% de Azul de Evans.

Em um grupo administraram-se, por via intradérmica, 0,1 ml de LEPURON. Após 15 minutos, os animais foram sacrificados, a pele retirada e observado o eventual extravasamento de plasma corado.

No outro grupo foi administrado, sobre a pele, 0,4 ml de LEPURON. Estes animais foram continuamente expostos ao sol, sendo sacrificados em grupos de 2 ratos e 1 cobaia cada 24, 48 e 72 horas após o tratamento. A pele foi retirada e observado o eventual extravasamento de plasma corado.

Experimento 4 – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Foram utilizados 20 camundongos e 12 cobaias procedentes do Biotério da F.C.A.V.J. – UNESP. Os camundongos foram separados em grupos de 5 animais cada que receberam 0,2 ml de solução de LEPURON na região dorsal sobre a pele, permanecendo em caixas em condições normais de biotério com água e ração “ad libitum”. Os grupos foram sacrificados 24, 48, 72 e 96 horas após a administração da droga, sendo colhidos fragmentos de pele para avaliação histopatológica.

As cobaias foram separadas em 4 grupos de 3 animais cada, que receberam 0,4 ml de LEPURON, como nos camundongos. Os diferentes grupos permaneceram sob irradiação solar durante 1, 2, 3 e 4 dias, findos os quais foram sacrificados e a pele retirada para posterior exame histopatológico.

Experimento 5 – AVALIAÇÕES HEMATIMÉTRICA, SOROLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA EM BOVINOS.

Foram utilizados 6 bovinos, mestiços, machos, de aproximadamente 1 ano de idade. Os animais foram separados em 3 grupos de 2 animais cada, assim distribuídos: I – Controle (veículo); II – LEPURON, via transcutânea dorso lombar (5 mg/kg); III – LEPURON, via transcutânea dorso lombar (10 mg/kg), sendo o composto teste aplicado uma única vez. Foram colhidas amostras de sangue antes do início do experimento e diariamente, durante 7 dias após a aplicação da droga. Foram avaliados os seguintes parâmetros: n. total de hemácias e de leucócitos; hemoglobina; hematócrito; contagem diferencial das células da série branca; proteína total; transaminases; fosfatase alcalina; uréia; desidrogenase láctica; creatinina; glicose; sódio; potássio; cálcio e fósforo. Ao final do experimento (7o. dia), os animais foram sacrificados e colhidos fragmentos de fígado, baço, cérebro, rim, coração e pele (local de aplicação do produto), que foram fixados em formol a 10%, durante 24 horas e processados segundo técnicas histológicas de

rotina para a obtenção de secções de 7 μ m de espessura, corados pela hematoxilina-eosina.

3 – RESULTADOS

Experimento 1 – TESTE DE INOCUIDADE

Os resultados obtidos indicaram ser o composto totalmente inócuo, nas duas espécies estudadas, quando avaliados os seguintes parâmetros: sialorréia; alteração do diâmetro pupilar; micção; defecação; motilidade espontânea; alteração de comportamento; convulsão e morte. Na concentração de 1000 mg/kg, os camundongos demonstraram diminuição da motilidade espontânea e ligeira alteração de comportamento.

Experimento 2 – DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL₅₀)

O cálculo da DL₅₀, levando-se em conta os resultados obtidos, resultou no valor 2.828 mg/kg. A partir deste dado foi possível calcular o Índice Terapêutico (IT), resultante da divisão da DL₅₀ sobre a dose efetiva 50% (DE₅₀) teórica de 10 mg/kg. Assim:

$$IT = \frac{DL_{50}}{DE_{50}} = \frac{2.828 \text{ mg/kg}}{10 \text{ mg/kg}} = 283$$

Experimento 3 – PERMEABILIDADE VASCULAR

Em todos os animais em que foi administrado LEPURON, por via intradérmica, observou-se um significativo aumento da permeabilidade vascular, indicado por evidente extravasamento de plasma corado. Por outro lado, naqueles animais onde o composto foi administrado sobre a pele, mesmo expostos ao sol, 1, 2, 3 e 4 dias, não se observou extravasamento do corante.

Experimento 4 – AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.

Na pele dos camundongos não se observaram alterações dignas de nota, em nenhum dos grupos experimentais, salvo certo aplainamento da epiderme, que mostrava até 2 camadas de células, em alguns animais.

A avaliação histopatológica da pele de cobaias submetidas a diferentes períodos de irradiação solar não mostrou alterações dignas de nota, em nenhum dos grupos experimentais. Entretanto, nos animais expostos 2 dias ao sol, observou-se uma área de descamação epitelial discreta e, nos expostos 4 dias, discreta vacuolização da epiderme em focos isolados.

Experimento 5 – AVALIAÇÕES HEMATIMÉTRICA, SOROLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA EM BOVINOS.

Os resultados obtidos demonstraram que o composto não

alterou de forma significativa nenhum parâmetro estudado, permanecendo estes dentro dos limites normais para a espécie considerada.

Ao exame histopatológico dos fragmentos de tecidos colhidos dos animais tratados não se detectaram alterações que pudessem ser imputadas diretamente ao tratamento utilizado. Alterações como hiperplasia de polpa branca esplênica e presença de ninhos de *Sarcocystis* sp apato-gênico, no miocárdio, foram encontradas igualmente no grupo controle.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que o composto é muito bem tolerado na dose recomendada para uso clínico.

O elevado Índice Terapêutico (IT = 283) confere ao produto uma ampla margem de segurança em sua aplicação, embora deva ser considerado que este índice foi obtido em camundongos, podendo haver variação nesta resposta, dependendo da espécie utilizada no teste (ZBINDEN & FLURY-ROVERSI⁶).

Com relação à permeabilidade vascular, os resultados são

significativos para se afirmar que o LEPURON não provoca alterações neste parâmetro em até pelos menos 72 horas após sua aplicação. O fato do composto promover um aumento da permeabilidade, quando aplicado por via intradérmica, pressupõe que o composto não deva ser aplicado sobre áreas lesadas.

A análise dos valores obtidos na avaliação hematimétrica e sorológica de bovinos tratados com LEPURON levam à sugestão de que este composto não interfere com estes parâmetros fisiológicos desta espécie animal. A inexistência de parâmetros comparativos, na literatura pertinente, dificulta uma discussão mais profunda desses resultados.

O exame histopatológico, realizado em animais de laboratório, sugere fortemente que o composto em estudo não induz alterações significativas na pele dos animais tratados, mesmo na vigência de exposição prolongada ao sol (4 dias). Os resultados obtidos na avaliação histopatológica dos vários órgãos e tecidos de bovinos tratados corroboram a afirmação de que a formulação LEPURON, na dose recomendada, é praticamente destituída de efeitos colaterais indesejáveis.

ABSTRACT

A research was undertaken in order to evaluate eventual toxicological side effects induced by the transcutaneously administration of (-) - 2, 3, 5, 6 - Tetrahydro - 6 - phenylimidazo - (2,1 b) thiazole a 20% (LEPURON) on the dorsal-lombar region of laboratory animals and bovines. Results showed that this compound was unable to induce any change in the following parameters investigated: i. nocuity, DL₅₀, vascular permeability, hematology, blood biochemistry and histopathology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMOUR, J. Modern anthelmintics for farm animals. In: *Pharmacological basis of large animal medicine*. Oxford Blackwell Scientific Publications, 1983. p. 174-209.
2. COSTA, A.J.; VIEIRA, P.F.; VASCONCELOS, O.T. Eficiência antihelmíntica do Levamisole a 20% aplicado na região dorso-lombar de bovinos. In: CONGRESSO DA FEDERACION LATINO AMERICANA DE PARASITÓLOGOS, 4, São Paulo, 1983. Resumos. p. 248.
3. HSU, W.H. Toxicity and drug interactions of levamisole. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 176(10): 1166-1169, 1980.
4. JANSSEN, P.A.J. The levamisole story. In: PROGRESS IN RESEARCH. Basel and Stuttgart, Verlag, 1976. p. 347.
5. THOMPSON, F.; WEIL, T. (1952) apud CARROL, S.W. Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD₅₀ and ED₅₀) and instructions in their use. *Biometrics*: 249, Sept., 1952.
6. ZBINDEN, G.; FLURY-ROVERSI, F. Significance of the LD₅₀ - Teste for the toxicological evaluation of chemical substances. *Arch. Toxicol.*, 47:77-79, 1981.
7. ZIPRIN, R.L.; STEEL, E.G.; PETERSEN, H. DEL VAR; ELISSALDE, M.H. Hematology study of effects of levamisole on stressed cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 41(11): 1884-1885, 1980.