

Estudi *in vitro* dels efectes embriotòxics de l'antiparasitari triclabendazol en embrions de rosegador i de peix zebra

Núria Boix Sabrià

Unitat de Toxicologia
Departament de Farmacologia i Química Terapèutica
Facultat de Farmàcia

nuriaboix@ub.edu

Grups de Recerca participants en el treball



**Grup de Recerca en
Toxicologia**
Universitat de Barcelona

GRET

Grup de Recerca consolidat de la
Generalitat de Catalunya
2014 SGR 566

**Departament de Biologia
Cel·lular, Fisiologia i
Immunologia**

Universitat Autònoma de
Barcelona

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

Facultat de Ciències Veterinàries

Universitat Nacional de
Cajamarca (Perú)



Universidad Nacional
de Cajamarca

Finançament i Publicacions

Projecte MCI2011D: *Evaluación del riesgo para la salud humana causado por los residuos de Triclabendazol (TCBZ) presentes en leche y queso de Cajamarca, Perú, procedentes de ganado con gran incidencia de Fasciola hepatica*. Finançat per Universitat de Barcelona, Cooperació Internacional



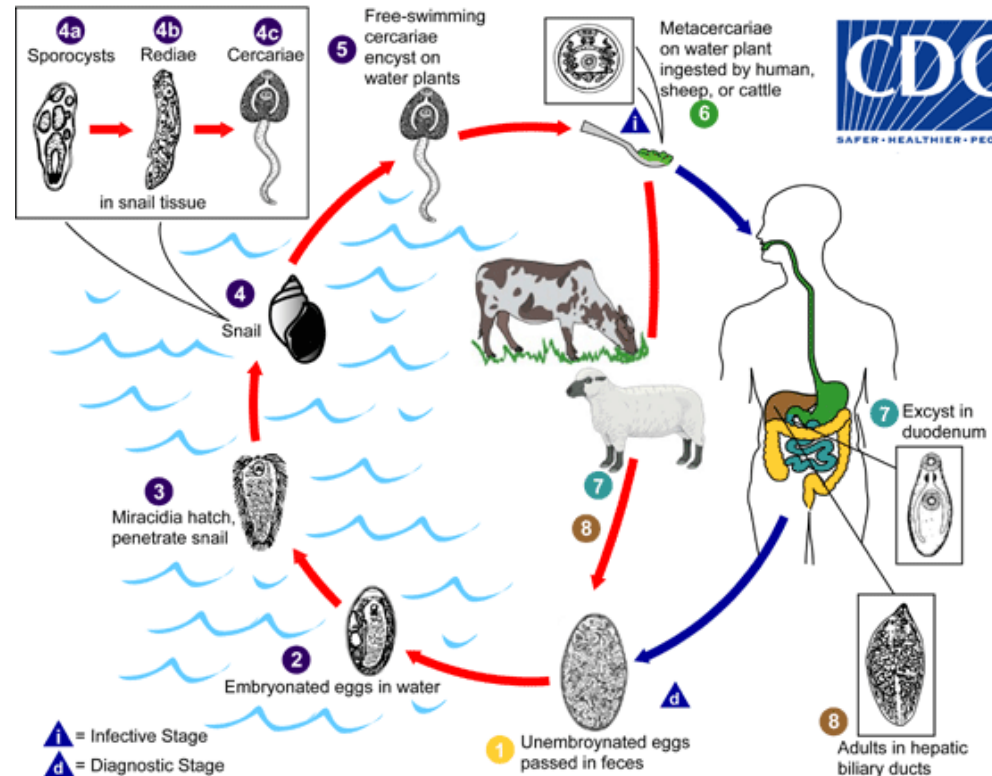
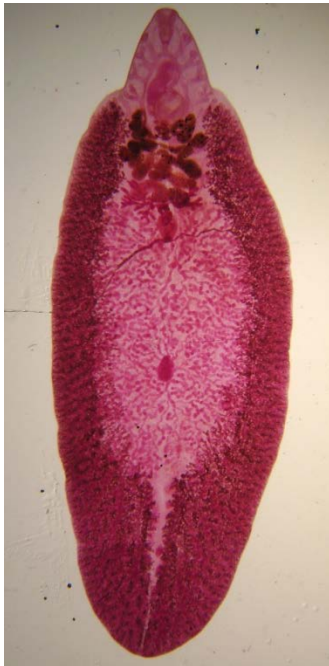
RESEARCH ARTICLE

Triclabendazole Sulfoxide Causes Stage-Dependent Embryoletality in Zebrafish and Mouse *In Vitro*

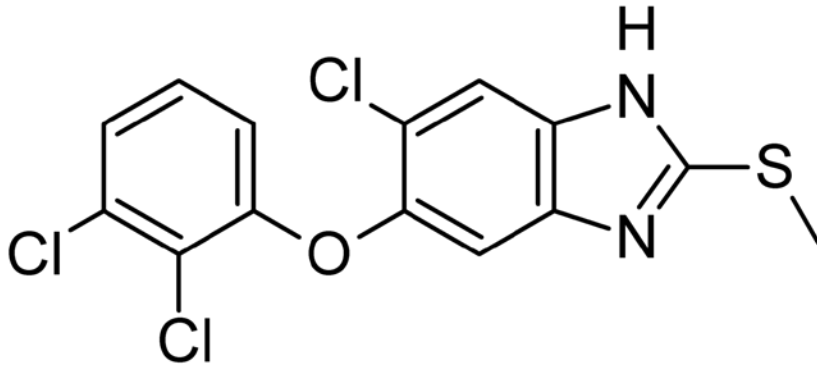
Nuria Boix¹, Elisabet Teixido^{1,2}, Marta Vila-Cejudo³, Pedro Ortiz⁴, Elena Ibáñez³, Juan M. Llobet¹, Marta Barenys^{1,5*}

Fasciola hepatica

- Paràsit trematode, causant de la *Fascioliasi*.
- Majoritàriament afecta animals (vaques i ovelles), també pot afectar humans → Zones endèmiques



Triclabendazol



TCBZ

5-chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-(methylthio)benzimidazole
CAS number 68786-66-3

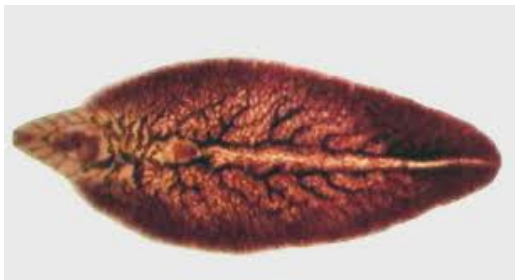
- Antihelmíntic família benzimidazols.
- Aprovat com a medicament d'ús veterinari.
- Tot i no estar registrat per a ús humà, la OMS el recomana com a tractament d'elecció per la *Fascioliasi*.

- Actiu sobre formes madures i immadures del paràsit

↳ Dones embarassades i nens

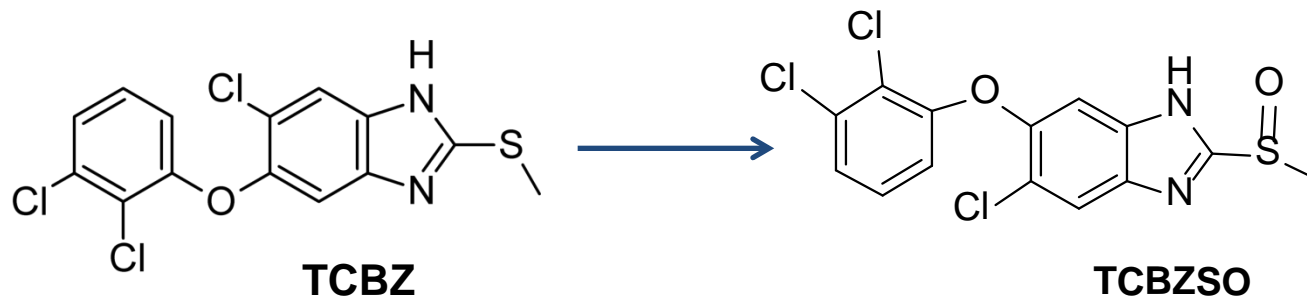
Triclabendazol

- La major part dels compostos de la família dels benzimidazols són teratogènics.
- Escassos estudis dels efectes del TCBZ sobre el desenvolupament embrionari.
- Diferències d'efecte entre els compostos parentals i els metabòlits.
- No té assignació de categoria de la FDA.
- El fet que la FDA canvia la categoria estudiats. (Els beneficis potencials poden garantir l'ús del fàrmac durant l'embaràs a pesar dels riscos potencials.)

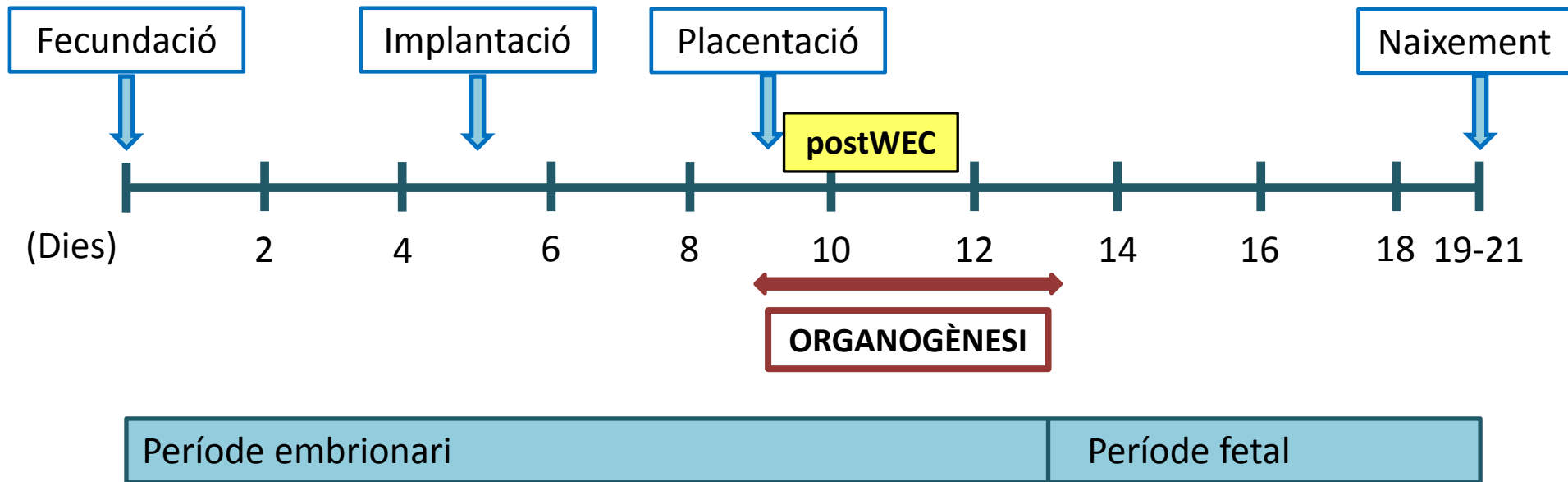


OBJECTIUS

- Avaluar la toxicitat en el creixement i desenvolupament embrionari del TCBZ.
- Estudiar la relació entre el potencial efecte en el desenvolupament embrionari produït pel TCBZ i el seu metabòlit TCBZSO.

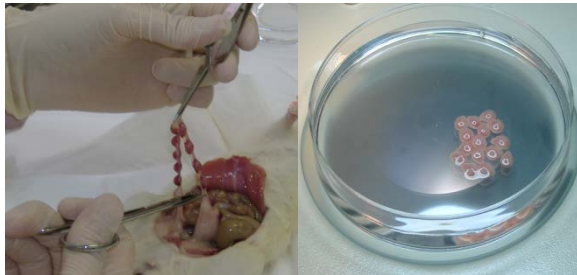


Desenvolupament embrionari dels rosegadors



postWEC: Cultiu d'embrions sencers de rata post implantació

Cultiu d'embrions de rata post implantació, postWEC



Extracció de l'úter i
aïllament dels embrions



Selecció dels embrions



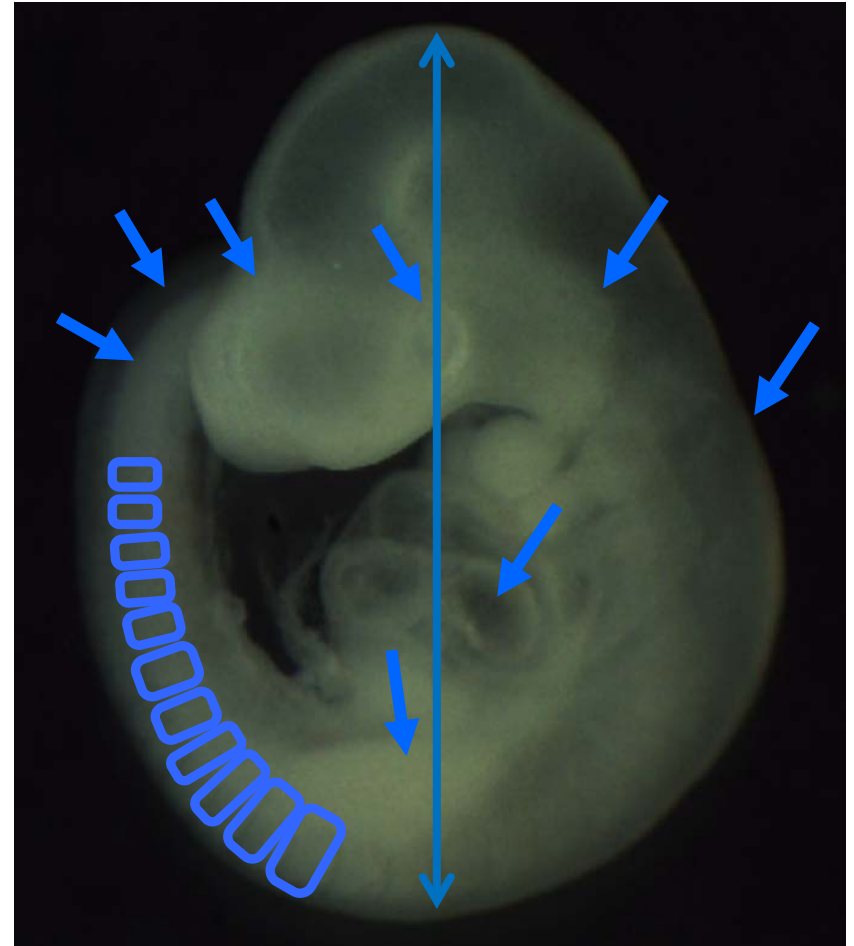
48 hores
37°C
20rpm

Cultiu d'embrions de rata post implantació, postWEC

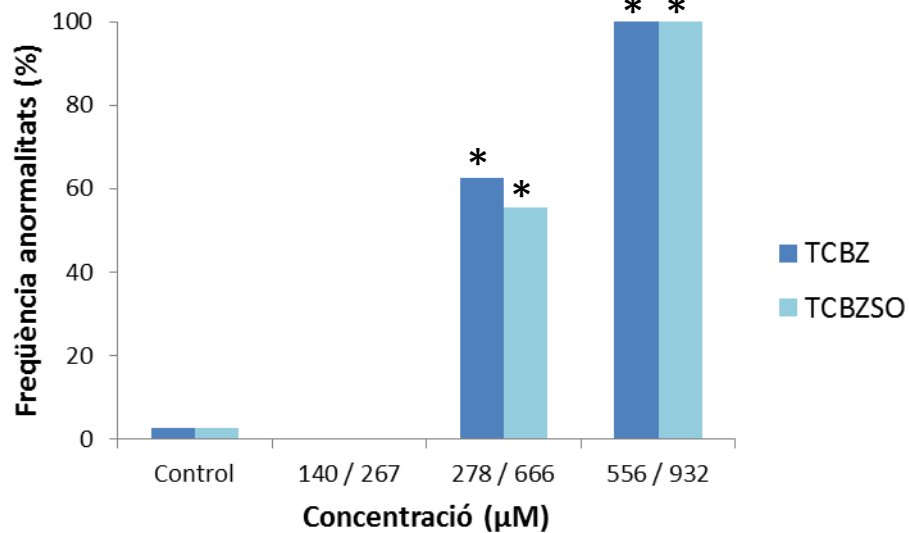
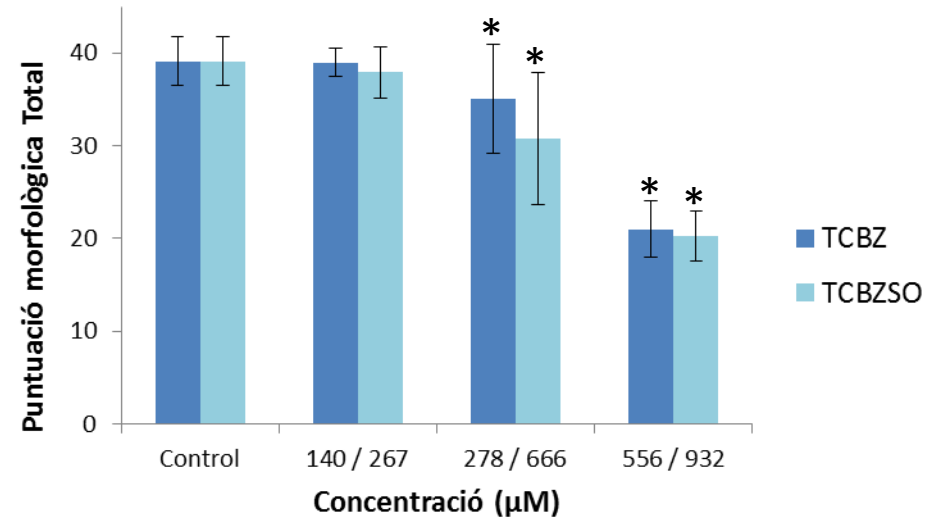
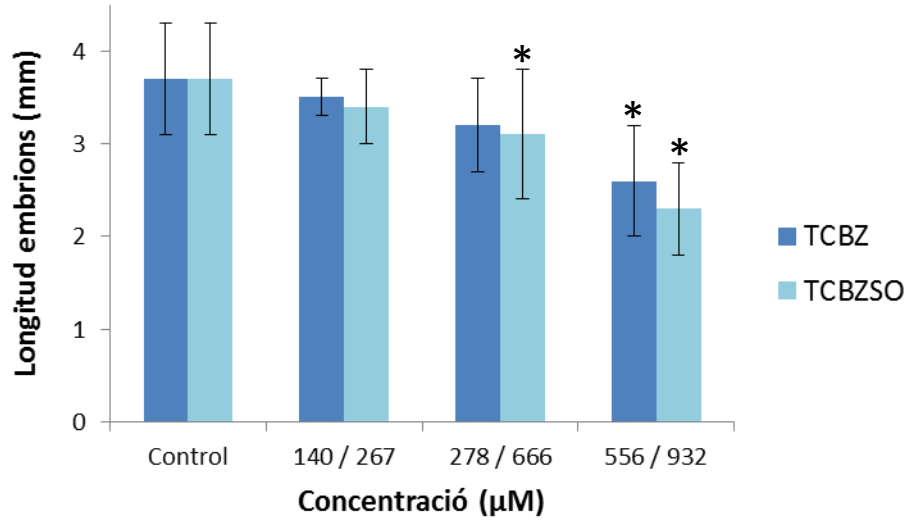
Paràmetres funcionals



Avaluació creixement i diferenciació



RESULTATS postWEC



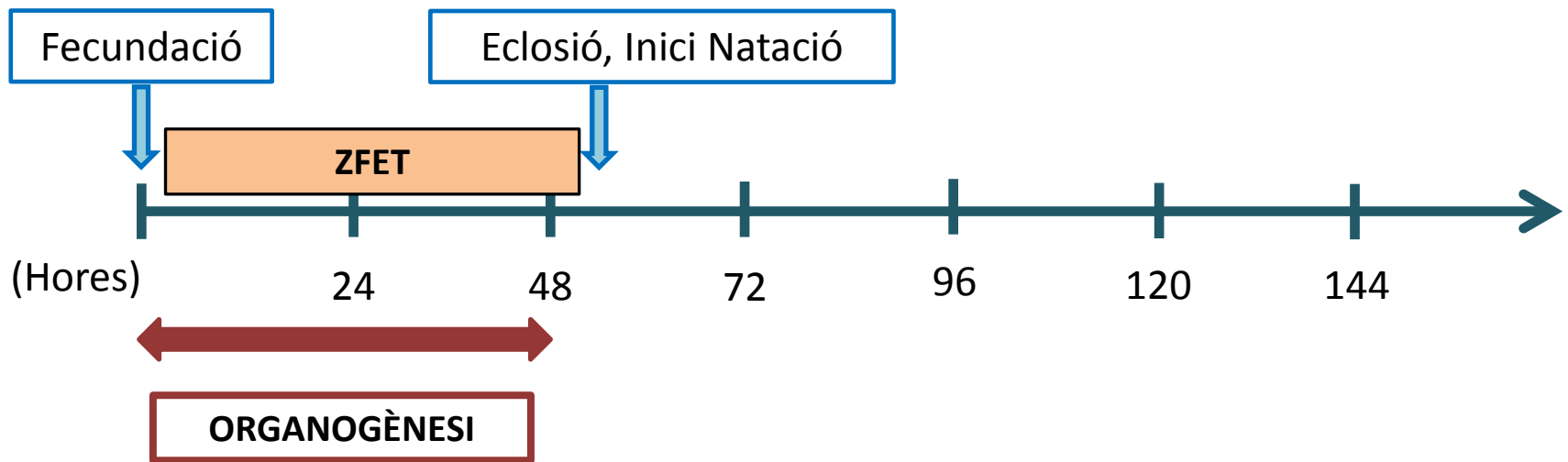
RESULTATS postWEC

| | NOAEC | LOAEC | Anormalitats |
|--------|-------|-------|--|
| TCBZ | 140µM | 278µM | Sac vitel·lí Arcs branquials Flexió Vesícules òptiques i òtiques |
| TCBZSO | 267µM | 666µM | Sac vitel·lí Arcs branquials Flexió Cap Vesícules òptiques i òtiques |

Concentracions de TCBZ i TCBZSO rellevants *in vivo* en humans: 1- 40 µM

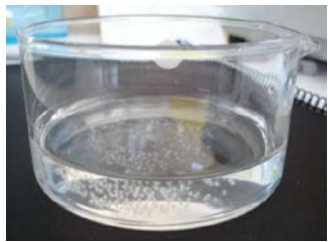
- El TCBZ i el TCBZSO no presenten potencial teratogènic *in vitro* en embrions de rata post implantació.

Desenvolupament embrionari del peix zebra



ZFET: Test amb embrions de peix zebra

Test amb embrions de peix zebra, ZFET



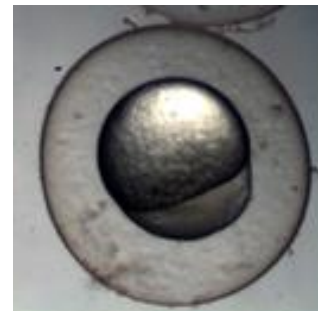
Neteja extensiva
amb aigua ISO



Control de fecundació



Fecundat



No fecundat

10 ous/concentració



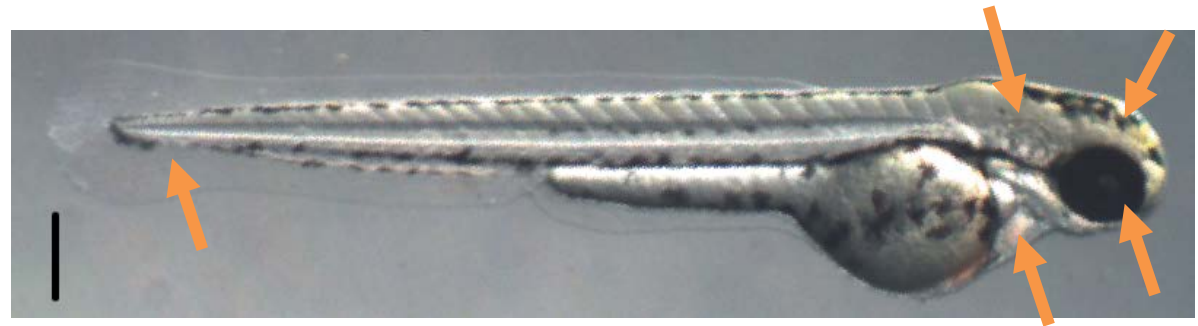
48 hores

27 °C ± 1 °C

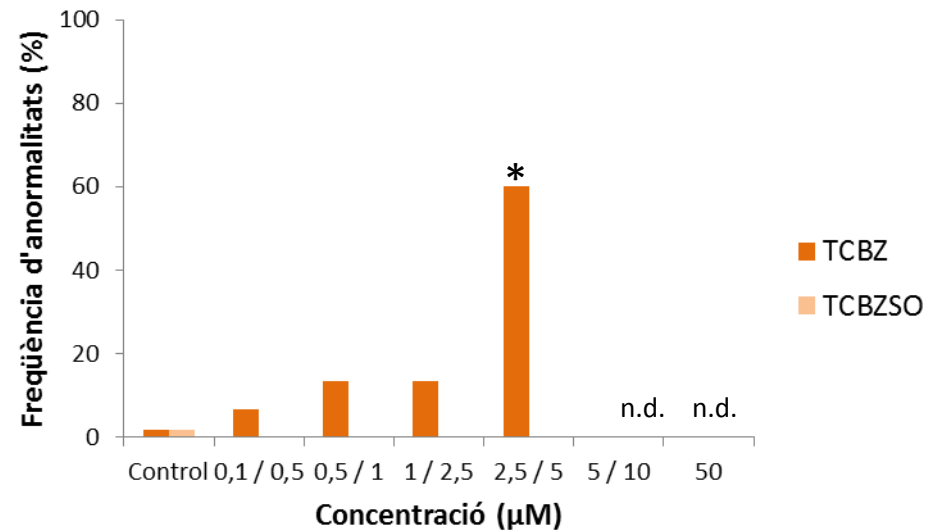
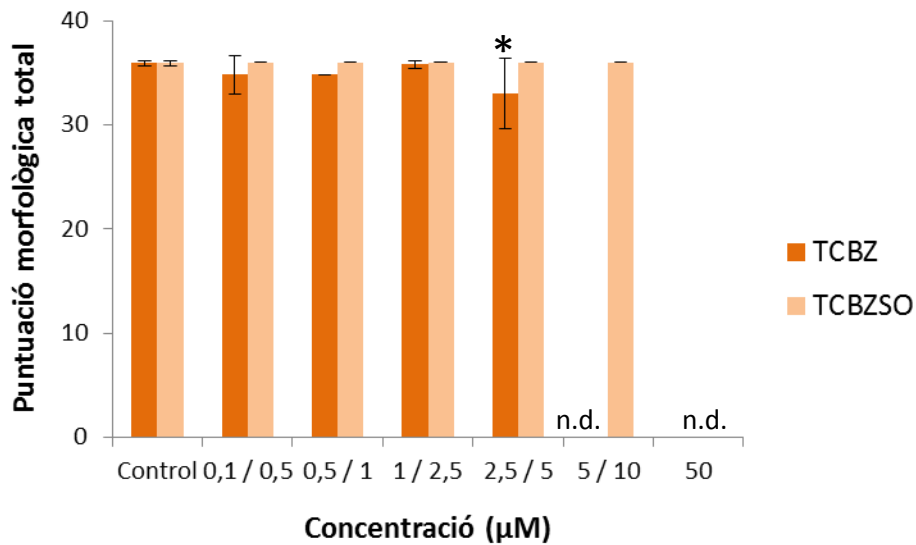
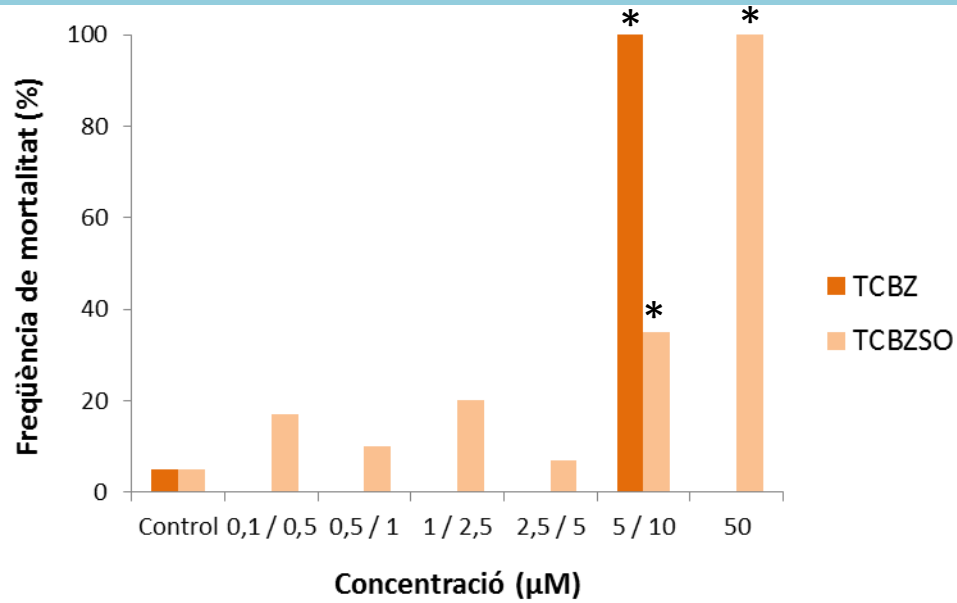
Cicle Llum/Foscor 14/10 hores

Test amb embrions de peix zebra, ZFET

Avaluació de paràmetres funcionals i estructurals



RESULTATS ZFET



RESULTATS ZFET

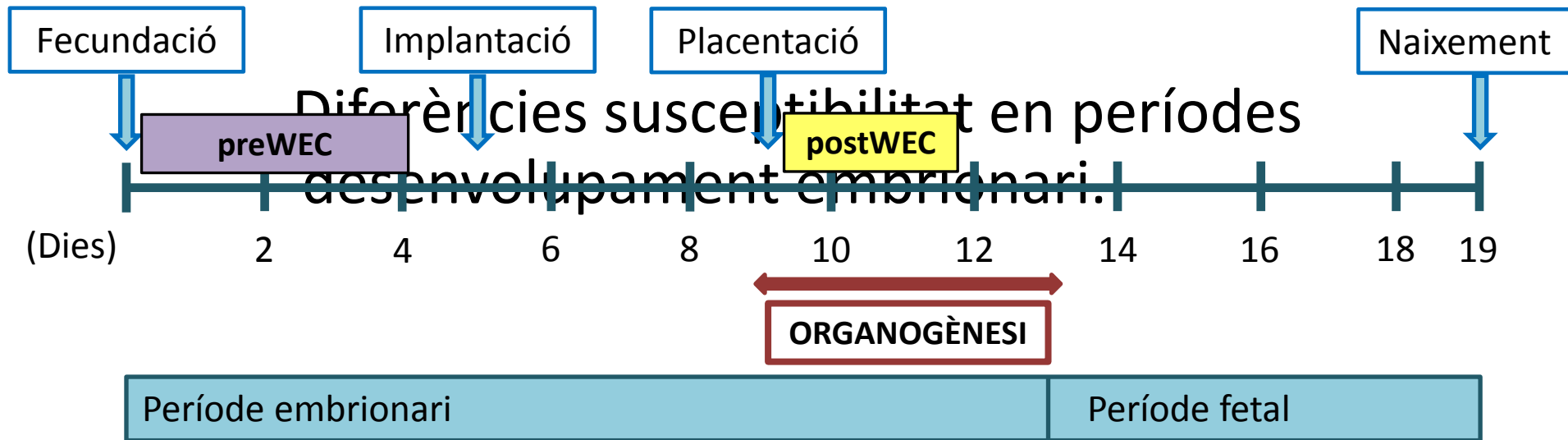
| | NOAEC | LOAEC | Comentaris |
|--------|-----------|-------------|--|
| TCBZ | 1 μ M | 2,5 μ M | 5 μ M, 100% mortalitat a les 50hpf 2,5 μ M, Anormalitats morfològiques |
| TCBZSO | 5 μ M | 10 μ M | 10 μ M, 100% mortalitat a les 26hpf No efectes PMT No anormalitats morfològiques |

Concentracions de TCBZ i TCBZSO rellevants *in vivo* en humans: 1- 40 μ M

- El TCBZ produeix mortalitat i anormalitats morfològiques en embrions de peix zebra.
- El TCBZSO és embriotòxic en embrions de peix zebra.

Diferències entre postWEC i ZFET

- **Desenvolupament embrionari dels rosegadors**
 - Diferències susceptibilitat inter-espècies.



preWEC: Cultiu d'embrions sencers de ratolí pre implantació

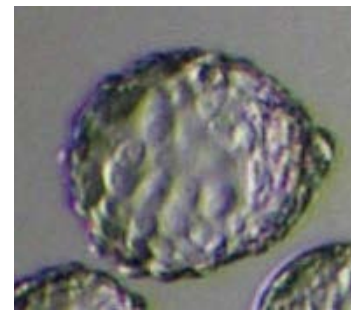
Cultiu d'embrions de ratolí pre implantació, preWEC



2- cèl·lules
(24 hores)



4- cèl·lules
(48 hores)



Mòrula
(72 hores)



Blastocist
(96 hores)

RESULTATS preWEC

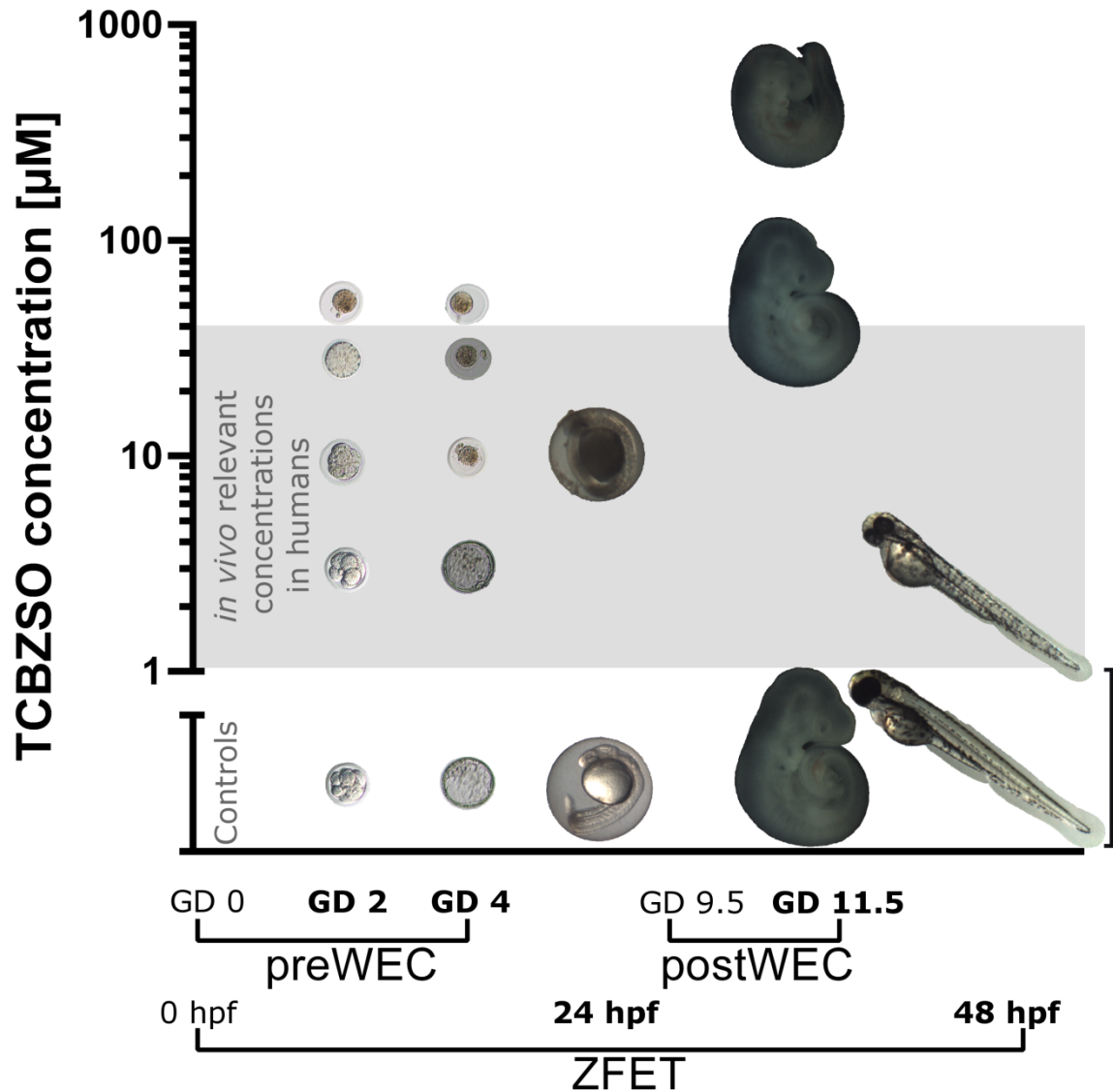
- **Freqüència de mortalitat (%)**

| | | 2-cèls | 4-cèls | Mòrula | Blastocist |
|---------|--------|--------|--------|--------|------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| Control | | 2,1 | 4,2 | 6,3 | 22,9 |
| TCBZ | 1 µM | 4,2 | 8,3 | 8,3 | 18,8 |
| | 3 µM | 6,3 | 6,3 | 10,4 | 20,8 |
| | 10 µM | 18,4 * | 24,5 * | 24,5 * | 36,7 |
| TCBZSO | 3 µM | 4,2 | 14,6 | 16,7 | 31,3 |
| | 10 µM | 24,5 * | 30,6 * | 36,7 * | 55,1 * |
| | 30 µM | 24,5 * | 79,6 * | 95,9 * | 98 * |
| | 100 µM | 100 * | 100 * | 100 * | 100 * |

Concentracions de TCBZ i TCBZSO rellevants *in vivo* en humans: 1- 40 µM

- El TCBZ i el TCBZSO són embriotòxics en embrions de rosegador *in vitro* durant el període pre implantació.

RESULTATS



**Inter-species comparative
developmental timeline [GD/hpf]**

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

- La *Fascioliasi* afecta milions de persones, entre les que es troben dones en edat fèrtil.
- És important caracteritzar el risc associat al TCBZ durant l'embaràs.
- Les concentracions plasmàtiques de TCBZ són molt baixes, ja que principalment es metabolitza a TCBZSO.
- És important caracteritzar els efectes del TCBZSO en el desenvolupament embrionari.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

- L'exposició a TCBZ i TCBZSO durant el període post implantació en rosegadors va presentar un efecte teratogènic lleu.
- Els efectes tòxics es van observar a concentracions molt superiors a les que s'obtenen *in vivo* després de l'administració d'una dosi terapèutica de TCBZ.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

- Els resultats del ZFET indiquen que el TCBZ presenta major potencial teratogènic que el TCBZSO.
- El TCBZSO no produeix efectes teratogènics però sí que presenta un efecte embrioletal.
- Els efectes observats en ambdues tècniques són els efectes propis dels benzimidazols.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

- El TCBZ i el TCBZSO produeixen un augment significatiu de la mortalitat en embrions de rosegador pre implantació, en 24 hores i a concentracions baixes.
- Es manifesta el rellevant potencial embriotòxic del TCBZSO en etapes primerenques del desenvolupament embrionari.

CONCLUSIÓ FINAL

- El TCBZ, a concentracions del mateix ordre de magnitud que les que s'obtenen després de l'administració del tractament de la *Fascioliasi*, no comporta un potencial teratogènic *in vitro* durant la organogènesi, però el seu principal metabòlit, el TCBZSO presenta un alt potencial embriotòxic *in vitro* durant el període pre implantació.

- S'han de realitzar més estudis per tal d'elucidar el mecanisme d'acció embriotòxic del TCBZSO.
 - Exposició *in vivo* rosegadors gestants durant el període pre implantació.
 - Confirmar l'efecte embriotòxic depenent de l'etapa del desenvolupament.

MOLTES GRÀCIES

GRET



Universitat de Barcelona

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona



Universidad Nacional
de Cajamarca

nuriaboix@ub.edu