

#### **5.4.- ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL DOSIS REPETIDAS (14 DÍAS) EN RATAS.**

**Laboratorio:** Grupo Interlab, S.L.

**Sustancia de ensayo:** Producto farmacéutico

**s/ Referencia:** HI-2915-OR (2 unidades)

**Origen:** Chacón Farmacéutica

**Fecha de entrada:** 4-Enero-1996

**Nº de páginas:** 34

# **INDICE**

## **I.-OBJETIVO DEL ESTUDIO**

## **II.-MATERIAL Y MÉTODO**

### **1.-ESPECIE SELECCIONADA**

A.-Alojamiento

B.- Grupos de experimentación

### **2.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

### **3.-METODO OPERATIVO**

A.-Programación Experimental

B.-Administración de la sustancia de ensayo

## **III.- RESULTADOS**

### **ANEXOS**

1.- Pesos corporales

2.-Peso de órganos

3.-Leucocitos: Recuentos Diferenciales

4.-Leucocitos: Recuentos Totales

5.-Hallazgos de Necropsias

## **I.-OBJETIVO DEL ESTUDIO**

El objetivo de este ensayo es poner de manifiesto los efectos producidos por la sustancia de ensayo sobre ratas, tras su administración durante 14 días, por vía oral.

Una vez administrada la sustancia de ensayo durante el tiempo establecido, se procede al sacrificio de los animales, realizando una extracción de sangre para las determinaciones hematológicas, así como una necropsia y la toma de muestras para examen histológico

## **II.-MATERIAL Y MÉTODO**

### **1.- ESPECIE SELECCIONADA**

Para este estudio se utilizaron ratas albinas Wistar, jóvenes (tenían menos de 8 semanas de edad al comienzo del ensayo) y sanas. Las hembras eran nulípara y no estaban preñadas. Son animales de laboratorio criados en Francia y proporcionados por nuestro proveedor habitual IFFA CREDO para el estudio, habiendo superado satisfactoriamente todos los controles

#### A.- Alojamiento y mantenimiento

Una vez llegados a nuestras instalaciones, los animales fueron examinados cuidadosamente y alojados en jaulas con cubeta de macrolón y tapa de rejilla de acero inoxidable, agrupados de cinco en cinco, identificados individualmente y separados por sexos.

Se mantuvieron un periodo de 5 días para su aclimatación a las condiciones de nuestro laboratorio. Durante este periodo se mantuvieron bajo observación para detectar la posible aparición de cualquier patología o cambio de comportamiento.

Una vez finalizado el periodo de aclimatación, fueron asignados a diferentes grupos, adecuadamente identificados para el comienzo del experimento.

Las condiciones de laboratorio son controladas durante el ensayo, manteniéndose los siguientes valores.

- Temperatura a 20 °C ( $\pm$  3°C)
- Humedad relativa entre 30-70%
- Periodo de luz 12/12 horas luz/oscuridad

Los animales disponían de agua y comida “ad libitum” durante todo el periodo de aclimatación. Durante la fase experimental los comederos fueron retirados durante la noche, permaneciendo en ayunas hasta 1 hora después de la administración de la sustancia a ensayar con el fin de facilitar el sondaje y la asimilación de dicha sustancia.

La dieta administrada es pienso de mantenimiento, en granulo, para roedores (Rodent Toxicology Diet) suministrada por B K Universal.

### B.-Grupos de Experimentación y vías de administración

El ensayo se llevó a cabo con 2 lotes de animales agrupados de la siguiente manera:

Control	Agua	3 machos y 5 hembras
Administración oral	FR-91 1484	5 machos y 5 hembras

La dosis administrada había sido determinada por la dirección Técnica de Chacón Farmacéutica de acuerdo a la siguiente manera:

<b>GRUPO S/REF</b>	<b>DOSIS N/REF</b>	<b>VIA DE ADMINISTRACION</b>
CONTROL	1 ml /día Agua	Oral
HI-2915-OR	1 ml /día 1484	Oral

### 2.-PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra, de naturaleza líquida, fue preparada en el laboratorio de origen para su adecuada administración oral, siguiendo las instrucciones de la Dirección Técnica no siendo necesario ni la utilización de vehículo ni ningún tratamiento previo.

Los análisis de estabilidad y pureza del producto son responsabilidad del cliente.

Durante el periodo experimental, la muestra se mantuvo en refrigeración a 4°C protegida de la luz, de acuerdo con las instrucciones de Chacón Farmacéutica.

### 3.- METODO OPERATIVO

#### A.-PROGRAMACION EXPERIMENTAL

- Periodo de aclimatación: 5 días mínimo
- Periodo de administración: dos semanas, 4 días a la semana
- Sacrificio, extracción de sangre, necropsia, y toma de muestra para su examen histológico.

#### B.-ADMINISTRACION DE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Una vez terminado el periodo de aclimatación, los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche, administrándoles la sustancia de ensayo a primera hora del día mediante sonda gástrica.

Una hora después de la administración, se puso a disposición de los animales los comederos con dieta para roedores, permitiéndoles el consumo de alimento “ad limitum” durante 8 horas. No se racionó el agua durante el ensayo.

Para la administración oral se emplearon sondas gástricas metálicas. Se tomaron muestras de sangre de los animales en el grupo tratado, y cinco animales en el grupo control (3 machos y dos hembras) para la determinación hematológica de la serie blanca (Recuento Diferencial de Leucocitos expresado en porcentaje), los días 1 (antes de la primera administración), 3, 7 y 10. Las muestras de sangre se tomaron por punción de la oreja.

Una vez terminado el periodo experimental, los animales fueron sacrificados, siendo previamente anestesiados por inyección intraperitoneal con pentotal sódico, obteniéndose las muestras de sangre por punción cardiaca.

El experimento concluye a los 14 días para el grupo control y los días 16 y 17 para los machos y hembras, respectivamente, del grupo experimental.

Las muestras de sangre obtenidas al final del ensayo son procesadas con el fin de obtener los Recuentos Totales y Diferenciales de los Leucocitos. Los tejidos recogidos para su análisis histológico se incluyeron en solución de formol y enviados al laboratorio de análisis clínico HEMOS, para su procesado.

### **III.-RESULTADOS**

Se recogieron los siguientes datos a lo largo del ensayo:

#### Signos clínicos

Los animales fueron observados diariamente no habiéndose detectado ninguna alteración, signos clínicos ni cambios de comportamiento.

#### Mortalidad

No se produjo ninguna muerte de los animales de experimentación a lo largo del ensayo.

#### Pesos corporales

Se registraron los pesos corporales al inicio del experimento y con una periodicidad semanal hasta el último día del ensayo. Los valores son expresados en una tabla en el ANEXO I.

#### Peso de los órganos

Los resultados se expresan en la tabla recogida en el ANEXO II.

#### Leucocitos: Recuento Diferencial

Se realizó un recuento diferencial de leucocitos (formula leucocitaria) por extensión de sangre y tinción. Los resultados aparecen registrados en la tabla del ANEXO III.

#### Leucocitos: Recuentos totales

Al final del periodo de experimentación, se procedió a la extracción de sangre, mediante punción cardiaca, para realizar el recuento de leucocitos. Los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentotal sódico en solución acuosa. Los resultados se muestran en la tabla del ANEXO IV

#### Necropsia

Al término del ensayo, se llevó a cabo la necropsia de los animales: 5 animales del grupo control y todos los animales tratados. Los resultados se recogen en la tabla del anexo IV. Las alteraciones observadas se reducen a lesiones hemorrágicas y congestivas localizadas en la cavidad abdominal. Dado que la aparición de estas lesiones se produce en todos los casos en áreas cercanas al punto de inyección del anestésico utilizado para el sacrificio y que se presenta tanto en el grupo control como en el experimental, podrían ser atribuidas a una reacción tisular local producida por el efecto irritante del pentotal sódico.

### **DISCUSION Y CONCLUSION**

La sustancia FR-91 ha estimulado la producción total de leucocitos, detectado por el análisis estadístico, como un significativo incremento en el recuento diferencial, en relación con el grupo control.

Declaramos que el ensayo ha sido llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito.

Madrid 12-Abril-1996

M<sup>a</sup> José Benítez de Huelva

Paloma Azpetia



#### - LEUCOCYTES : TOTAL RECOUNTS.

At the end of the experimentation period, we proceed to the extraction of blood for the recount of leucocytes. It is performed by cardiac puncture, having the animals previously been anesthetized through intraperitoneal injection of sodic pentotal in watery solution. The results are shown in table of Annexe IV.

#### - NECROPSY.

At the end of the assay the necropsy of the animals used in the experiment is performed: five in the Control Group and all animals in the Treated Group. The results are gathered in table of Annexe V. The observed alterations are reduced to hemorrhagic and congestive lesions, located in the abdominal cavity. Since the appearance of such lesions is produced in all the cases in areas near the site of injection of the anesthetic used for the sacrifice, and since they are present in both, the control group and the experimental group, they could be attributed to the local tissular reaction produced by the irritating effect of the sodic pentotal.

#### IV DISCUSSION AND CONCLUSION.

The substance FR-91 has stimulated the total production of leucocytes detected by the statistical analysis up to a significant increase and the lymphocytes in the differential recount referred to the Control Group.

We declare that the assay has been performed following the described protocol.

Madrid, April 12th, 1996.

Handwritten signature of M<sup>o</sup> Jose Benitez de Huelva.

M<sup>o</sup> JOSE BENITEZ DE HUELVA  
Technical Supervisor

Handwritten signature of Paloma Azpeitia.

PALOMA AZPEITIA  
Laboratory Director