

DETERMINACION DE RESIDUOS DE WARFARINA EN BOVINOS TRATADOS CON VAMPIRINIP III^{1, 2}

ROSA M^a ANAYA y DÁVILA GARIBI³
BENITO CARRERA y DE LA TORRE⁴

Resumen

Se trataron 4 bovinos productores de leche con Vampirinip III, cuyo principio activo (warfarina) fue marcado con ¹⁴C. Se determinó la radioactividad total presente en las muestras de leche y en las de hígado, riñón, páncreas, corazón, pulmón, bazo y músculo, por el método de centelleo en líquidos. Se midió la radioactividad total y se consideró como warfarina, sin diferenciar metabolitos. Las concentraciones encontradas fueron menores a 3 ppm. Se consideran estos niveles muy bajos como para representar peligro para el humano que consuma los productos de los animales tratados.

La warfarina es el anticoagulante oral más potente, de los análogos sintéticos de la bishidroxycoumarina. Se utiliza en terapia humana para la prevención de trombosis a dosis que varían de 25-75 mg iniciales y 1.5 mg diarios subsiguientes (Goodman y Gilman, 1970; USP, 1965). No se conoce aún su mecanismo de acción, pero parece que actúa en el hígado, impidiendo la síntesis de protrombina a partir de vitamina K (Barker, Hermodson y Link, 1970; Shah y Suttie, 1971, Suttie, 1973). Los anticoagulantes orales se han usado satisfactoriamente como rodenticidas (Caswell, 1960), aunque O'Reilly (1968), Pool (1968) y Davis y Davies (1970), informaron la aparición de resistencia; se han usado también como vampiricidas: Linhart, Flores-Crespo y Mitchell usaron la clorofacinona (1972), Thompson, Mitchell y Burns la difenadiona (1972), y Flores-Crespo, Ibarra y De Anda (1976)

introdujeron el uso de la warfarina. Thompson, Mitchell y Burns (1972), administraron difenadiona por vía intrarruminal, mientras que Flores-Crespo y Said (1977), administraron la warfarina por vía intramuscular. Estos dos últimos métodos muestran una alta efectividad vampiricida, informándose también que no hay peligro para los animales tratados. Bullard, Thompson y Holguin (1976, 1977), encontraron 0.15 ppm o menos de difenadiona en hígado y riñón a los 90 días después del tratamiento y menos de 0.01 ppm en sangre, cerebro, grasa y músculo a los 30, 60 y 90 días después de administrar 1 mg/kg de difenadiona, según el método intrarruminal ya mencionado (Thompson, Mitchell y Burns, 1972). Cuando administraron 2.75 mg/kg encontraron en leche 21.3 ppb o menos a las 12, 24 y 48 hs después de la administración y nada después de las 72 hs. Los becerros alimentados de la leche de las vacas tratadas no presentaron ningún cambio en el tiempo de coagulación, ni presencia del producto en la sangre; en ambos trabajos se determinó la difenadiona por cromatografía gas-líquido. O'Reilly y Aggeler (1970) no encontraron warfarina, por análisis químico, en leche de dos mujeres sujetas a terapia con este anticoagulante.

Con objeto de esclarecer los peligros de toxicidad del uso amplio de la warfarina como vampiricida, con el método intramuscular propuesto por Flores-Crespo y Said (1977), se determinó realizar el estudio de cinética, distribución y metabolismo del compuesto, en bovinos. Los datos que aquí se presentan son

Recibido para su publicación el 15 de agosto de 1977.

¹ El estudio fue financiado parcialmente por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. José M^a Velasco N^o 75.

² En este estudio se utilizó material y se recibió asesoramiento técnico por parte del Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional N^o 2508, México, D.F.

³ Departamento de Control de Vectores. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH, km 15.5 Carretera México-Toluca. Palo Alto, D.F. Apartado Postal 41-652, México, D.F.

⁴ Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional N^o 2508, México, D.F.

CUADRO 1

Características del tratamiento

Vaca Núm.	FECHA Iniciación	FECHA Sacrificio	Duración (hs)	Peso (kg)	Cantidad de warfarina (Act. específica)
1	24-V-76	29-V-76	120	469	2.345 g (0.298 µCi/mg)
2	7-VI-76	12-VI-76	120	373	1.865 g (0.2499 µCi/mg)
3	14-VI-76	30-VI-76	384	478	2.390 g (0.230 µCi/mg)
4	12-VII-76	28-VII-76	384	359	1.795 g (0.362 µCi/mg)

parte del estudio que será objeto de otra publicación.

Material y métodos

Debido a que no se podían utilizar los mismos animales de experimentación como controles, dado que sería necesario tomar biopsias y eso produciría "stress", se obtuvieron en el mercado muestras de leche, hígado, riñón, bazo, páncreas, corazón, pulmón y músculo esquelético de 5 animales, estandarizando con estas muestras la técnica utilizada y determinando el "quenching". La detección de radioactividad se hizo en un espectrómetro de centelleo en líquidos, Packard modelo Tricarb 3330, según la técnica descrita para el uso del Instagel.* Para la calibración del espectrómetro se utilizó un es-

tándar de 14c.* Se trataron 4 bovinos adultos, de raza Holstein, en producción láctea, con Vampirinip III: 5 mg de warfarina**/kg por vía intramuscular, disuelta en solución acuosa alcalina y marcada con 14c Warfarina.*** Las características del tratamiento se muestran en el Cuadro 1.

Cada animal en experimentación se mantuvo en un corral adaptado como jaula metabólica y se le proporcionó una dieta a base de concentrado y alfalfa achicalada. Tuvieron libre acceso tanto al alimento como al agua. El corral de 5.20 × 4.40 m, se encontraba en el interior de un cuarto techado y estaba dividido longitudinalmente por una barda de 1.00 m de altura; las secciones quedaban comunicadas por medio de una puerta. Am-

* Packard Instrument Co.

** Warfarin K & K ICN, New York, U.S.A.

*** Warfarin 14c (3-Alfa-Acetyl [Alfa-14c] benzyl-4-hidroxicoumarin). Amersham - Searle Chicago, Ill. U.S.A.

* Marca Registrada de Packard Instrument Co. Inc.

CUADRO 2

Concentración de warfarina en leche (expresado en ppm)

Ordeña	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 4
1*	0.1459	0.0339	0.0640	0.1245
2*	0.1069	0.0505	0.0948	0.0693
3*	0.0678	0.0478	0.0948	0.0619
4*	0.0409	...	0.0725	0.0319
5*	0.0244	...	0.0614	0.0268
6*	0.0154	...	0.0491	0.0207
7*	*	...	0.0308	0.0183
8*	0.0107	...	0.0361	0.0099
9*	0.0094	...	0.0196	0.0096
10*	0.0158	0.0061
11*	SACRIFICIO	SACRIFICIO	0.0199	...
12*	0.0173	...
13*

* No se determinó.

Las vacas 1 y 2 se sacrificaron a las 120 horas y las 3 y 4 a las 384.

bas secciones tenían el piso en declive hacia una de las esquinas donde se localizaba un pozo colector de orina. El objeto de tener dos secciones fue poder coleccionar las muestras a intervalos de tiempo fijo, sin tener que mantener inmobilizado al animal, a fin de disminuir el "stress" que pudiera modificar los resultados.

Las muestras de leche se tomaron de todas las ordeñas desde el tratamiento hasta el sacrificio, y los de tejidos después de éste.

Resultados

La conversión de los valores de radioactividad a los equivalentes de warfarina se hizo de la siguiente manera:

- 1) $\text{cpm}^* \text{ experimentales} - \text{cpm experimentales del blanco} = \text{cpm netas.}$
- 2)
$$\frac{\text{cpm netas}}{\text{eficiencia del sistema}} \times 100 =$$

$$= \text{cpm reales en la muestra.}$$
- 3)
$$\frac{\text{cpm reales en la muestra}}{\text{eficiencia del aparato}} \times 100 =$$

$$= \text{dpm.}^{**}$$
- 4)
$$\frac{\text{dpm}}{2.22 \times 10^6} = \text{actividad en la muestra}$$

$$\text{tra (en } \mu\text{Ci).}^{***}$$
- 5)
$$\frac{\text{Actividad (en } \mu\text{Ci)}}{\text{Actividad específica de la warfarina}}$$

$$= \text{mg de warfarina en la muestra.}$$

Las muestras se trabajaron por triplicado, tomando el valor promedio (con un estrecho marco de referencia) en los resultados.

Los resultados obtenidos en leche se muestran en el Cuadro 2 y los obtenidos en tejidos en el Cuadro 3. Los datos están expresados en ppm, con base en la radioactividad total, ya que no se diferencié entre warfarina y sus metabolitos.

* cpm = cuentas por minuto.

** dpm = desintegraciones por minuto.

*** μCi = microcuries.

Como se puede ver en el Cuadro 2, aunque los valores más altos corresponden a las tres primeras ordeñas, ninguno sobrepasa a 1 ppm. No se pusieron el total de ordeñas de las vacas 3 y 4 ya que a partir de la 13ª ordeña (153 hs) todas las muestras fueron negativas. En el Cuadro 3 se puede ver que los datos más altos corresponden a la vaca 2, ya que presentó necrosis en la zona de la inyección, modificando la absorción y excreción de la droga.

Discusión

Desde un punto de vista estrictamente farmacológico, la warfarina es el anticoagulante oral más potente como despletor de los factores de coagulación dependientes de vitamina K; su potencia es quizá únicamente equiparable a la de la fenindiona, uno de los derivados de la indandiona, pero tiene mucho menor toxicidad que estos últimos. Es además soluble en diluyentes acuosos, por lo que puede administrarse con relativa facilidad por vía parenteral. Este hecho es importante ya que la administración intramuscular garantiza los niveles sanguíneos deseables. Todos estos factores, aunados a otros económicos, hacen del método descrito por Flores-Crespo y Said (1977), el mejor propuesto hasta ahora como vampiricida. Los resultados de este estudio confirman lo que han informado otros investigadores, aunque la mayoría de los trabajos se han realizado en otras especies, principalmente roedores (Anderson, 1967).

El análisis de los niveles de radioactividad encontrados en órganos y tejidos estudiados, demuestra que la warfarina se distribuye en casi todo el organismo, concentrándose particularmente en hígado, páncreas, riñón y bazo, mientras que en corazón, pulmón y músculo estriado se encontraron concentraciones mínimas. Entre los animales sacrificados a los 5 días y los sacrificados a los 16 días, en todos los órganos se observa una disminución en la concentración excepto en páncreas y en pulmón donde parece concentrarse al transcurrir el tiempo. Es muy importante señalar que en este trabajo se han supuesto las concentraciones como warfarina intacta y por ende con toda su potencialidad tóxica, ya que no se hizo distinción entre ella y sus metabolitos; Lewis *et al.* (1973), informan que la mayor parte de éstos son inactivos, por lo

CUADRO 3

Concentración de warfarina en tejidos (expresada en ppm)

Tejidos	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 4
Hígado	2.21	7.12	1.74	1.91
Riñón	1.20	2.76	0.68	0.49
Bazo	0.80	2.54	...	0.31
Páncreas	0.39	8.68	2.20	1.48
Pulmón	0.09	1.59	0.25	0.11
Corazón	0.27	1.04	0.15	0.05
Músculo	0.17	1.00	0.15	0.06

Las vacas 1 y 2 se sacrificaron a las 120 hs y las 3 y 4 a las 384 hs.

tanto es más válida la afirmación de la inocuidad del método intramuscular. Por otra parte es necesario mencionar que para el análisis de los resultados fueron descartados los datos de la vaca 2, ya que como se dijo hubo un problema de necrosis local haciendo poco confiables los datos obtenidos en este animal.

De los estudios hechos hasta la fecha, solamente merece comentario especial el realizado por Bullard, Thompson y Holguin (1976), quienes encontraron concentraciones mucho más bajas que las que se encontraron en este trabajo; por tal razón es necesario hacer notar lo siguiente: 1) en ese trabajo se administró 1 mg/kg mientras que en éste se administraron 5 veces más (5 mg/kg), 2) ellos administraron la droga por vía intrarruminal mientras que nosotros lo hicimos por vía intramuscular, presentando esta última una mejor absorción, y 3) en ese trabajo determinaron las concentraciones en tejidos a los 30, 60 y 90 días postratamiento, mientras que en este trabajo se hizo a los 5 y 16 días. Es raro que las cifras informadas por los autores mencionados no varíen a través del tiempo.

El mismo grupo en 1977 detecta niveles bajos de difenadiona en leche, que fueron dosis-dependientes. A dosis de 2.75 mg/kg por vía intrarruminal detectaron 21.3 ppb a las 12, 24 y 48 horas después de la administración de la droga. Con estos niveles no hubo cambios en el tiempo de protrombina del plasma de los becerros amamantados por las vacas tratadas.

La excreción de la warfarina es fundamentalmente por orina y secundariamente por heces. La eliminación por leche representa una proporción mínima del total (0.1%) por lo

cual no se vieron efectos en los becerros que ingirieron leche de animales tratados como fue descrito por De Anda y Flores-Crespo (1977).

Para tener una idea objetiva del peligro que representaría la ingestión de warfarina a través de los órganos o tejidos de los animales tratados, se ha preparado el Cuadro 4 donde se muestran las cantidades (en kg) necesarias para apenas alcanzar la dosis mínima terapéutica o sea 25 mg.

Las cifras ya expuestas permiten asegurar la inocuidad que representa para el humano la ingestión de los productos de los animales tratados con warfarina (Vampirinip III). A pesar de que este análisis permite establecer importantes conclusiones, solamente el estudio de la cinética y metabolismo de la droga serán concluyentes.

CUADRO 4

Cantidad de órganos o tejidos (en kg) que se deberán ingerir para alcanzar 25 mg de warfarina

Tejido u órgano	A los 5 días	A los 16 días
Hígado	11.5	13.1
Riñón	21.0	42.0
Bazo	30.0	84.0
Páncreas	60.0	13.1
Pulmón	278.0	126.0
Corazón	92.5	252.0
M. estriado	139.0	252.0

PARA LECHE: 200 litros de la 1ª ordeña (9 hs) después de la administración.

Summary

Vampirinip III, whose active ingredient (Warfarin) was labeled with ^{14}C was administered to four dairy cows. Total radioactivity present in milk, liver, kidney, pancreas, heart, lung, spleen and muscle was determined by the method of liquid scintillation.

Total radioactivity was measured and considered as warfarin, without differentiating metabolites. The concentrations found was less than 3 ppm. These levels were considered too low to be dangerous for human consumption of the products derived from the treated animals.

Literatura citada

- ANDERSON, G.F., 1967, The distribution of warfarin (coumarin) in the rat, *Thrombo Diathes. haemorrh.*, 18:754-758.
- BELL, R.G.; J.A. SADOWSKI and J.T. MATSCHINER, 1972, Mechanism of action of warfarin. Warfarin and metabolism of vitamin K, *Biochem.*, 11(10): 1959-1961.
- BULLARD, R.W.; D. THOMPSON and G. HOLGUIN, 1976, Diphenadione residues in tissues of cattle, *J. Agric. Fd. Chem.*, 24(2):261-263.
- BULLARD, R.W.; D. THOMPSON and G. HOLGUIN, 1977, Diphenadione residues in milk of cattle, *J. Agric. Fd. Chem.*, 25(1):79-81.
- CASWELL, R.L., 1959, Report on rodenticides, *J. of AOAC*, 42(1), 104.
- DAVIS, R.J. and B.H. DAVIES, 1970, The biochemistry of warfarin resistance in the rat, *Biochem. J.*, 118 (3):44-45, Ref. 21.
- DE ANDA, L.D., y R. FLORES-CRESPO, 1977, Tiempo de protrombina de becerros alimentados con leche de vacas tratadas con Vampirinip III, *Téc. Pec. Méx.* 33:71-73.
- FLORES-CRESPO, R.; F. IBARRA V., y D. DE ANDA L., 1976, Vampirinip II. Un producto utilizable en tres métodos para el combate del murciélago vampiro, *Téc. Pec. Méx.*, 30:67-75.
- FLORES-CRESPO, R., y S. SAID F., 1977, Efectividad de un vampiricida sistémico experimental (Vampirinip III) en condiciones de laboratorio, *Téc. Pec. Méx.* 33:59-62.
- GOODMAN, L.S. and A. GILMAN, 1970, The pharmacological basis of therapeutics, Fourth edition, *The McMillan Company*, Nueva York, USA.
- LEWIS, R.J.; W.F. TRAGER; A.J. ROBINSON and K.K. CHAN, 1973, Warfarin metabolites: The anticoagulant activity and pharmacology of warfarin alcohols, *J. Lab. Clin. Med.*, 81(6):925-931.
- LINHART, S.B.; R. FLORES-CRESPO, y G.C. MITCHELL, 1972, Control de murciélagos vampiros por medio de un anticoagulante, *Bol. Of. San. Pan.*, 63(2): 100-109.
- O'REILLY, R.A.; J.G. POOL and P.M. AGGELER, 1968, Hereditary resistance to coumarin anticoagulants in man and rat, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151 (Art 2): 913-31.
- O'REILLY, R.A. and P.M. AGGELER, 1970, Citado por Bullard R.W. et al. 1977, Diphenadione residues in milk of cattle, *J. Agric. Fd. Chem.*, 25(1), 79-81.
- POOL, J.G.; R.A. O'REILLY; L. SCHNEIDERMAN and M. ALEXANDER, 1967, Studies on warfarin resistance in rat, *Am. J. Physiol.*, 215(3):627-631.
- THOMPSON, R.; MITCHELL C. and BURNS R., 1972, Vampire bat control by systemic treatment of livestock with an anticoagulant, *Science*, 177:806-808.
- USP (The United States Pharmacopeia) 1965, Seventeenth Revision, Official Copy, *Mack Publishing Company*, Easton, P.A.

Agradecimientos

Se agradece al M.V.Z. Donaciano De Anda L., biólogo Raúl Flores-Crespo y Sr. José Raúl Almanaci, del Departamento de Control de Vectores; al Dr. Eliseo Hernández del Departamento de Derriengue; a la Q.F.B. Irma Tejada de Hernández, del Departamento de Nutrición, y a la Q. M^a Antonieta Graña, del Departamento de Constatación, todos ellos del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, por su colaboración en la realización de este trabajo. Al Sr. Jesús Medina Dávila, del Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por su ayuda técnica, y al Ing. Roger Wolf, de Instrumental Technion, S.A., por su asesoramiento técnico.