

## **Estrategias farmacológicas contra la resistencia a drogas antihelmínticas en ovinos:**

### **Modulación in vivo de la glicoproteína-P en el huésped y en los parásitos resistentes**

**Lifschitz Adrián<sup>1,2</sup>; Virkel Guillermo<sup>1,2</sup>; Lloberas Mercedes<sup>3</sup>;  
Alvarez Luis<sup>1,2</sup>; Entrocasso Carlos<sup>3</sup>; Ballent Mariana<sup>1,2</sup>;  
Sallovitz Juan<sup>1</sup>; Maté Laura<sup>1,2</sup>.**

1. Laboratorio de Farmacología, Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
3. Laboratorio de Parasitología, EEA INTA Balcarce

La población mundial se encuentra en constante crecimiento y ello implica un aumento en la demanda de alimentos. Según estimaciones de la FAO, para el año 2050 la población mundial será de 9500 millones de habitantes y la globalización de los modelos de consumo de alimentos necesitan de una mayor producción de carne y leche. El aumento de la productividad de los diferentes sistemas ya sea bovinos u ovinos necesitan de un control eficiente de las enfermedades que afectan a los rumiantes. El control de las enfermedades parasitarias constituye una de las principales medidas para disminuir las pérdidas clínicas y subclínicas que ellas producen. Aunque en los últimos años estrategias alternativas han sido desarrolladas (vacunas, hongos nematófagos, animales resistentes), el uso de drogas antiparasitarias sigue siendo la herramienta más importante para el control de nematodos en las diferentes especies pecuarias. Ivermectina (IVM) es el fármaco antihelmíntico más utilizado para el control de parásitos en bovinos y ovinos. IVM pertenece a la familia de las lactonas macrocíclicas y se caracteriza por su amplio espectro contra endo y ecto parásitos. IVM, al igual que las restantes lactonas macrocíclicas, son moléculas grandes de elevada lipofilidad que le permite llegar en altas concentraciones a su sitio de acción (McKellar y Benchaoui, 1996, Lifschitz et al, 2000). Desde su introducción en el mercado farmacéutico veterinario en 1981, IVM ha sido ampliamente utilizado contra endo y ectoparásitos convirtiéndose rápidamente en una de las principales drogas en todo el mundo (Crump y Otoguro, 2005).

El efecto farmacológico obtenido tras la administración de una droga depende de la interacción de ésta con su receptor (fase farmacodinámica). Para obtener un efecto farmacológico óptimo son necesarias concentraciones efectivas del

fármaco en el sitio de acción (biofase) durante un cierto período (Lanusse y Prichard, 1993). De esta manera, los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (fase farmacocinética) influyen directamente en las concentraciones de droga que alcanzan el sitio de acción y, por lo tanto, en su efecto farmacológico. Mientras que los procesos de absorción y distribución determinan el pasaje del fármaco desde su sitio de administración hacia la circulación sistémica y su llegada a la biofase, los procesos de biotransformación (metabolismo) y excreción determinan la finalización de la acción del fármaco en el organismo (Riviere 1999).

En los últimos años, un nuevo paradigma se ha incorporado al estudio farmacocinético de diversos grupos de drogas con la participación de diferentes transportadores celulares de membrana en los procesos de absorción, distribución tisular y excreción de compuestos farmacológicamente activos. De todos los transportadores celulares identificados, la glicoproteína-P (gp-P) ha sido la más estudiada. Si bien la gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples drogas anticancerígenas, también se localiza en células normales de tejidos involucrados en los procesos de absorción, distribución, y excreción de fármacos (Ballent et al., 2005). Esta proteína actúa como una bomba de eflujo que es capaz de bombear una amplia gama de compuestos hacia el exterior celular por un proceso dependiente de energía. La localización específica en estos tejidos sugiere que la gp-P cumpliría un importante rol en la regulación del transporte de fármacos, modificando de este modo el comportamiento cinético y la biodisponibilidad de los mismos (Schinkel, 1997). La Figura 1 muestra la influencia de las proteínas transportadoras como la gp-P en el proceso farmacocinético de diferentes drogas.

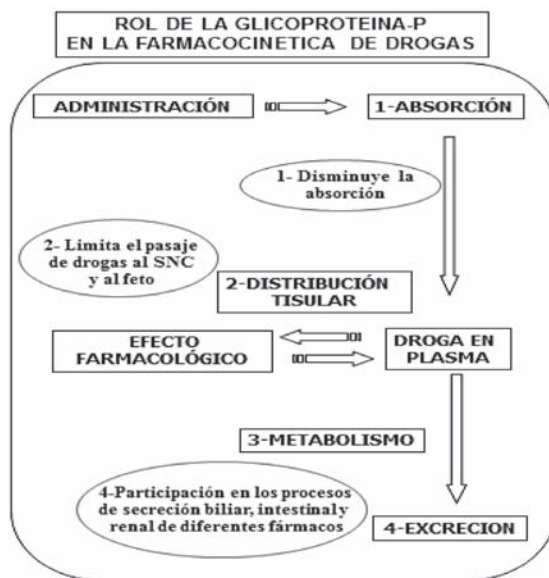
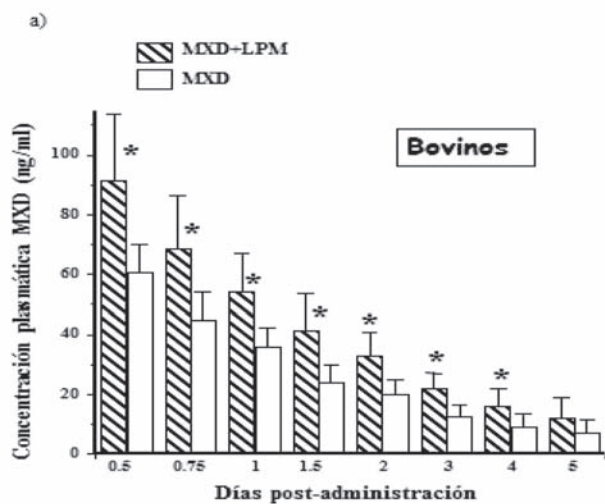


Figura 1

El comportamiento farmacocinético de IVM ha sido estudiado en profundidad en diferentes especies. La elevada eliminación fecal de IVM como droga madre estaría dada por procesos de secreción biliar e intestinal mediados por gp-P (Lifschitz et al, 2000, Laffont et al., 2002). En este contexto, la co-administración in vivo de IVM y otras drogas relacionadas con agentes que interfieran con la actividad de gp-P (agentes moduladores) ha sido evaluada en diferentes especies (Lifschitz et al., 2002, Lifschitz et al., 2004, Ballent et al., 2007,). Loperamida (LPM) es un derivado opiáceo que se ha clasificado como un modulador de gp-P (Schinkel et al., 1996). La co-administración de LPM junto a los antiparasitarios IVM o moxidectin (perteneciente al igual que IVM al grupo de drogas llamado lactonas macrocíclicas) produjo cambios farmacocinéticos en ratas y en bovinos sin ningún efecto tóxico (Lifschitz et al., 2002, 2004). Tras la coadministración con el modulador de gp-P (LPM), no solo se aumentaron las concentraciones del antiparasitario en el plasma sino también en los sitios de localización parasitaria. La Figura 2 muestra las concentraciones plasmáticas de moxidectin (a) en bovinos y de IVM (b) en ratas luego de la administración del antiparasitario solo o coadministrado con LPM.

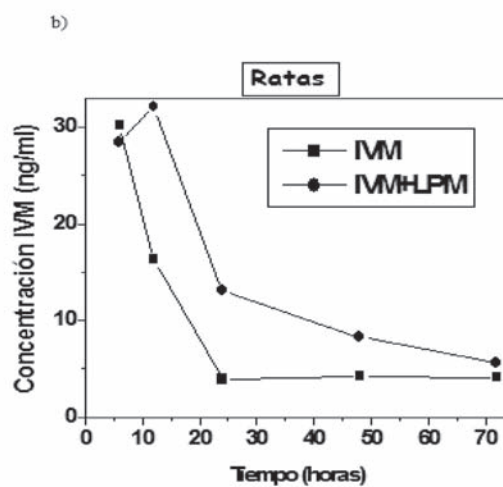
Además de su rol en la farmacocinética de drogas de diferentes especies de mamíferos, la gp-P tiene una importante implicancia en los mecanismos de resistencia a diferentes tipos de fármacos. La gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples drogas anticancerígenas (Ling Thompson, 1974). Evidencias posteriores condujeron a proponer que el eflujo mediado por gp-P sería un posible mecanismo de resistencia antiparasitarios como IVM por parte nematodos, reduciendo la concentración del antiparasitario en el sitio de acción en el parásito. (Prichard y Roulet 2007). El problema actual de la resistencia a los diferentes grupos de antiparasitarios es un tópico que preocupa en los diferentes países con importantes producciones de bovinos y ovinos. Tras varios años de uso intensivo de IVM para optimizar la productividad de diferentes sistemas pecuarios, la inevitable aparición de resistencia hacia esta droga ha ocurrido por parte de diferentes géneros parasitarios (Geary, 2005). En la actualidad, la resistencia a IVM y otros compuestos relacionados se ha generalizado en los nematodos de los pequeños rumiantes y se está convirtiendo en una seria preocupación en los parásitos gastrointestinales que afectan a los bovinos (Anziani et al., 2004). Teniendo en cuenta el complejo proceso que implica el descubrimiento e introducción de nuevas drogas antiparasitarias al mercado farmacéutico veterinario, la alta tasa de resistencia a las moléculas existentes es una seria amenaza para los diferentes sistemas extensivos de producción pecuaria.

Figura 2



Adaptado de Lifschitz et al., 2002, JVPT

Figura 2



Adaptado de Lifschitz et al., 2004, JPP

Teniendo en cuenta que no existen evidencias suficientes sobre el impacto que este tipo de interacción farmacocinética puede tener sobre la eficacia in vivo frente a nematodos resistentes en ovinos, la modulación de la actividad de la gp-P en el huésped y en parásitos resistentes constituye una herramienta farmacológica muy importante para entender estas complejas interacciones biológicas. Para llegar a una mejor comprensión, esta problemática puede ser abordada utilizando diferentes metodologías in vivo y ex vivo que permiten profundizar los resultados obtenidos. El estudio en un ensayo estandarizado de los cambios inducidos por la coadministración de LPM como modulador de gp-P tanto en la disposición plasmática de IVM y en su eficacia en corderos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales junto con la evaluación de la actividad intestinal de gp-P utilizando la técnica de las cámaras de Ussing permitió obtener un importante avance en el estudio de este tipo de interacciones. Adicionalmente la utilización de las técnicas de biología molecular para el estudio de la gp-P en las cepas de parásitos resistentes (*H. contortus*) permite correlacionar dicha expresión con los resultados obtenidos en el ensayo fármaco-parasitológico. La Figura 3 muestra el abordaje integral en el estudio de la modulación de la gp-P en los ovinos y en los nemátodos resistentes como *H. contortus*

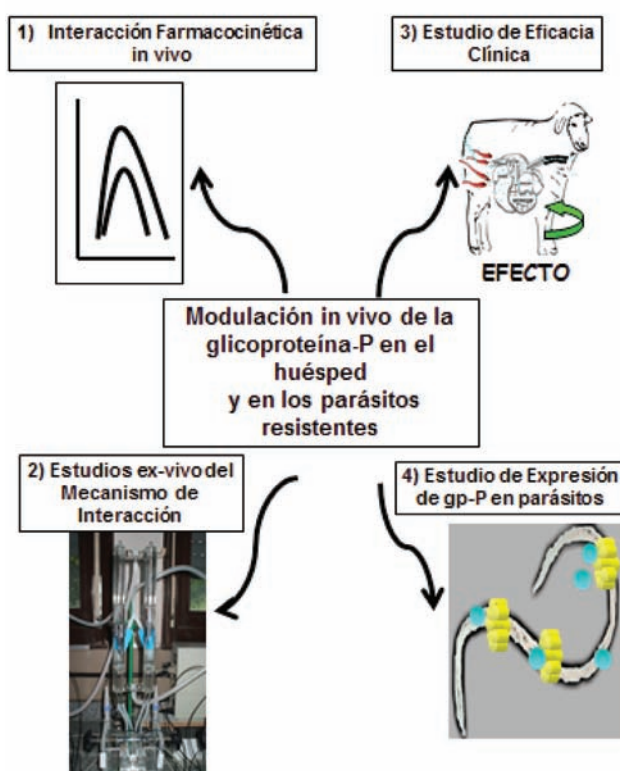
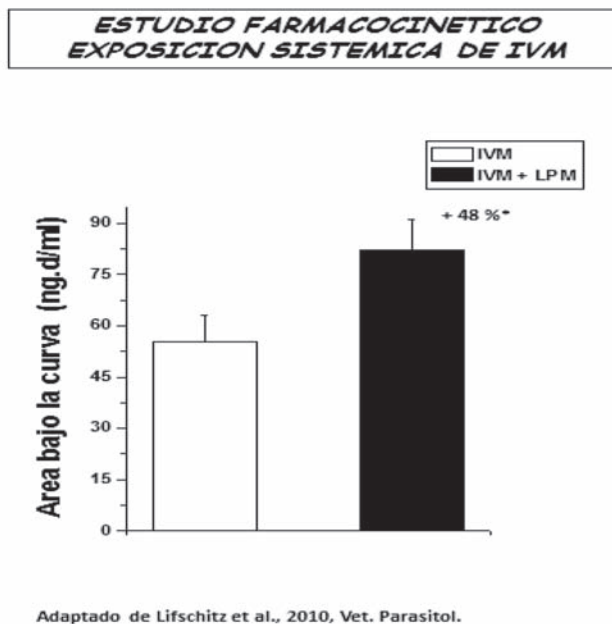


Figura 3

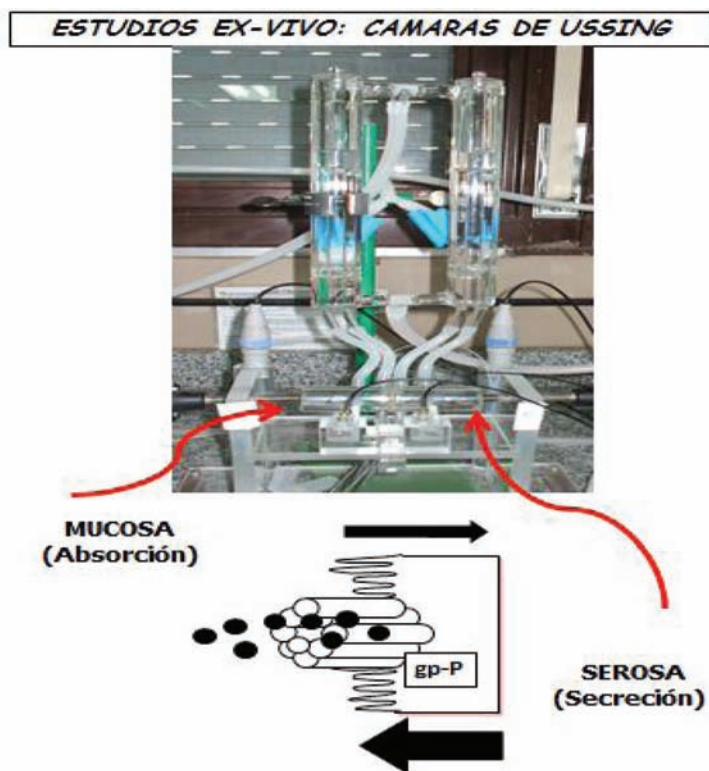
La evaluación de la interacción in vivo se realizó a través de un estudio fármaco-parasitológico estandarizado utilizando ovinos infestados naturalmente con parásitos resistentes a la IVM. Luego de administrar a la IVM sola y junto con LPM como modulador de la gp-P se tomaron las muestras de sangre para caracterizar las concentraciones plasmáticas del antiparasitario a lo largo del tiempo. La disponibilidad sistémica de IVM en el torrente sanguíneo (medida como valores de área bajo la curva) se incrementó un 48 % después de la coadministración con LPM (Figura 4), lo que concuerda con la mejora obtenida en los trabajos previos en ratas (Lifschitz et al., 2004) y bovinos (Lifschitz et al., 2002, 2010). De esta manera se corroboraron las modificaciones farmacocinéticas tras la co-administración de IVM con el modulador de gp-P (LPM).



**Figura 4**

El mecanismo de interacción de la IVM puede estudiarse a través de los experimentos ex vivo con las cámaras de Ussing. Esta metodología permite estudiar el transporte de sustancias a nivel intestinal pudiendo caracterizar el movimiento de las mismas desde la mucosa hacia la serosa intestinal (proceso de absorción) o desde la serosa hacia la mucosa intestinal (proceso de secreción). En presencia de una elevada actividad de proteínas transportadoras como gp-P a nivel intestinal, el proceso de secreción de sustratos de esta proteína transportadora es cuantitativamente mayor que el de absorción. Se

corroboró la importancia del eflujo intestinal mediado por gp-P en el intestino de ovinos y la interacción de la IVM con la gp-P intestinal mediante un novedoso sistema ex -vivo que permite estudiar este tipo de fenómenos con precisión. La alta afinidad de la IVM por la gp-P se caracterizó al disminuir el eflujo intestinal del tradicional sustrato de esta proteína transportadora, rodamina 123, en presencia del antiparasitario. La Figura 5 muestra las bases que fundamentan el uso de las Cámaras de Ussing para estudiar el transporte intestinal mediado por proteínas transportadoras como gp-P.



**Figura 5**

La búsqueda de la interacción entre drogas antiparasitarias como la IVM y la P-gp no solo en el huésped sino también a nivel del parásito fue previamente abordada en estudios in vitro con estadios larvarios y en animales de laboratorio. Los datos obtenidos en estudios in vitro con estadios larvarios que muestran una interacción a nivel del parásito deben ser confirmados con ensayos in vivo realizados en condiciones de campo. Además de las modificaciones farmacocinéticas obtenidas, la co-administración de IVM junto a LPM resultó en una mayor eficacia contra nematodos gastrointestinales

resistentes. La reducción de huevos en materia fecal fue de 78.6 % luego del tratamiento con IVM sola y del 96% cuando se administró junto con LPM. Por otra parte la reducida actividad IVM en contra de algunas especies de nematodos fue confirmado en la prueba de eficacia controlada. *Haemonchus spp* demostró ser muy resistente a la IVM (totalmente ineficaz con una eficacia de 0%). En el intestino delgado, se observó una reducida eficacia de IVM (inferior al 90%) contra *Trichostrongylus colubriformis* (77.9%). Tras la coadministración con LPM la eficacia frente a *Haemonchus spp* y *Trichostrongylus colubriformis* aumentó hasta 72.9 y 96.3%, respectivamente (Tabla 1).

Dentro de los potenciales mecanismos propuestos de resistencia a las lactonas macrocíclicas como IVM un mayor eflujo de droga mediado por la gp-P en el parásito ha sido propuesto (Xu et al, 1998; Kerbouef et al, 2002). Para evaluar la posible participación de la gp-P en la resistencia a IVM por parte de los nematodos presentes en los ovinos usados en este trabajo, se utilizó como modelo a *Haemonchus spp* y se evaluó la expresión de esta proteína transportadora en comparación a la obtenida en una cepa susceptible de éste parásito utilizando técnicas de biología molecular. La expresión de gp-P en *Haemonchus spp* resistente a IVM recuperados de ovinos infestados fue significativamente mayor (3.13 veces) que la obtenida en los adultos recuperados de los ovinos infestados con una cepa susceptible. Los acontecimientos fármaco-parasitológicos que tienen lugar después de la modulación de la gp-P en el hospedador indican que la modulación in vivo del transporte de drogas como la IVM mediado por gp-P no solo puede ocurrir en el huésped sino también en los parásitos que infestan a los animales tratados. Esto adquiere importancia teniendo en cuenta, tal como se demostró en el presente trabajo, que parásitos resistentes como *Haemonchus* sobreexpresan a la gp-P.

**Estudio de la eficacia clínica  
-Test Controlado-**

GRUPO	Haemonchus spp.		Trichostrongylus Colubriformis		Nematodirus spp.	
	Media Geom	Eficacia %	Media Geom.	Eficacia %	Media Geom.	Eficacia %
Control	277	-	4705	-	484	-
IVM	489	0	1041	77.9	70	85.6
IVM + LPM	76	72.9	174	96.3	38	92.1

**Tabla 1**

Adaptado de Lifschitz et al., 2010, Vet. Parasitol.



La integración entre la información fármaco- parasitológica es importante para mejorar la comprensión de la relación entre la farmacocinética de las drogas y su eficacia. Dado el creciente problema de resistencia a diferentes drogas antiparasitarias usadas en bovinos y ovinos, resulta crucial encontrar herramientas que optimicen el uso de las mismas en los diferentes sistemas de producción. El impacto de la modulación de la gp-P en corderos naturalmente infectados pudo ser corroborado in vivo y los mecanismos de interacción de IVM con este transportador en el intestino de ovinos han sido estudiados por métodos ex – vivo. Teniendo en cuenta que las diversas gp-Ps que expresan los parásitos (Williamson y Wolstenholme 2011) presentan algunas diferencias con la de los mamíferos, se abre el enorme desafío de desarrollar inhibidores específicos de estas proteínas a nivel parasitario que no interaccionen con transportadores del huésped, evitando cualquier interferencia con otras funciones fisiológicas. Aunque es necesario seguir profundizando antes de disponer de herramientas de uso práctico, los resultados aquí presentados son una fuerte evidencia de que la modulación in vivo de gp-P puede ser útil para prolongar la eficacia de algunos de los compuestos antiparasitarios, al menos en las primeras etapas de desarrollo de resistencia.

## **Bibliografía**

- Anziani, OS., Suarez, V., Guglielmo, AA., Warnke, O., Grande, H., Coles, GC., 2004. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Vet. Parasitol.* 122, 303-6.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C., 2007. Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 242-248.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Lanusse C., 2005. Caracterización del rol de los transportadores celulares: implicancias terapéuticas en medicina veterinaria. *Anal. Vet.* 25, 36-47.
- Crump, A., Otoguro, K., 2005. Satoshi Omura: in pursuit of nature's bounty. *Trends Parasitol.* 21, 126-32
- Geary, T.G., 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol.* 21, 530-2.
- Kerboeuf, D., Guegnard, F., Le Vern, Y., 2002. Analysis and partial reversal of multidrug resistance to anthelmintics due to P-glycoprotein in *Haemonchus contortus* eggs using *Lens culinaris* lectin. *Parasitol. Res.* 88, 816–821.
- Laffont, CM., Toutain, PL., Alvinerie, M., Bousquet-Melou, A., 2002. Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 30, 626-30.

Lanusse, C., Prichard, R., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123-158.

Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M., Lanusse, C., 2000. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to tissues of parasitic location in cattle. *Vet. Parasitol.* 87, 327-338.

Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Lanusse, C., 2002. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 25, 111-120.

Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Lanusse, C., 2004. Loperamide modifies the tissue disposition kinetics of ivermectin in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 61-67.

Lifschitz A., Sallovitz J., Imperiale F. Suarez V., Cristel S., Ahoussou S., Lanusse C., 2010. Modulation of P-glycoprotein enhances ivermectin and moxidectin systemic availabilities and their efficacy against resistant nematodes in cattle. *Exp. Parasitol.* 125, 172-178.

Lifschitz A., Entrocasso, C., Alvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, G., Virkel, G., Borda, B., Lanusse, C. 2010. Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Vet. Parasitol.* 172, 291-298

Ling, V., Thompson, L.H., 1974. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell Physiol.* 83, 103-116.

McKellar, Q., Benchaoui, H., 1996. Avermectins and milbemycins. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 19, 331-351.

Prichard, R.K., Roulet, A., 2007. ABC transporters and  $\beta$ -tubulin in macrocyclic lactones resistance: prospects for marker development. *Parasitology* 134, 1123-1132.

Riviere, J.; (1999). *Comparative pharmacokinetics: principles techniques and applications.* Iowa State University Press, 2121 South State Avenue, Ames, Iowa, USA.

Schinkel, A., Wagenaar, E., Mol, C., van Deemter, L., 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Inves.* 97, 2517-2524.

Schinkel AH., 1997. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.* 8, 161-170.

Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R., Prichard, R., 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 327-35.

Williamson, SM., Wolstenholme, AJ., 2011. P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *J. Helminthol.* 1,1-7.