

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Evaluación cinético-dinámica *in vivo* e *in vitro* en
Haemochus contortus resistente a lactonas macrocíclicas

María Mercedes Lloberas

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.



2018

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Evaluación cinético-dinámica *in vivo* e *in vitro* en *Haemochus contortus* resistente a lactonas macrocíclicas

Por: María Mercedes Lloberas

Director: Dr. Adrián L. Lifschitz

Co-Director: Dr. Carlos M. Entrocasso

Facultad de Ciencias Veterinarias

UNCPBA

Miembros el jurado:

Prof.: Dr. Oscar S. Anziani

Prof.: Dr. Rubén Pérez Fernández

Dedicatoria

A Rosario, Pilar y Juan Manuel

Agradecimientos

- A Adrián Lifschitz, por darme la oportunidad de realizar mi Doctorado bajo su supervisión, por su respeto y confianza, por su inagotable perseverancia y por ser un excelente mentor,
- a Carlos Entrocasso, por ser parte fundamental de mi formación, por orientarme e impulsarme en el desarrollo profesional y personal,
- a mi familia, por saber esperar y acompañarme,
- a Carlos Lanusse, por abrirme las puertas del Laboratorio de Farmacología y supervisar el desarrollo de esta Tesis,
- a Sonia Luque y Patricia Cardozo, por cubrir mis ausencias en el trabajo diario, por acompañarme afectuosa y desinteresadamente,
- a los integrantes del Laboratorio de Farmacología, por el cariño con que me recibieron y el apoyo a lo largo del desarrollo de esta Tesis, principalmente a Nacho Alvarez y Willy Virkel por el apoyo brindado; a Mariana Ballent y Laura Maté, por su colaboración y paciencia,
- a Sergio Dininno, por su siempre buena predisposición y su responsabilidad en el manejo de los animales y a Bernardino Borda por su colaboración en los trabajos de campo y laboratorio,
- a César Fiel y Pedro Steffan por acompañarme en este camino y por contagiarme su entusiasmo por la parasitología,
- a la Comisión de Doctorado de la FCV, UNCPBA y especialmente a los evaluadores externos e internos de la presente Tesis, por sus valiosos aportes,
- a todos los que de una u otra forma fueron partícipes de esta Tesis.

Resumen

La parasitosis gastrointestinal continúa siendo una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción pecuaria y dentro de ella, la haemonchosis es sin duda la enfermedad más patógena y la que mayores pérdidas genera en la producción ovina. El control de las parasitosis debiera consistir en diversas estrategias de manejo de los animales y las pasturas junto con la administración de antihelmínticos, luego del diagnóstico parasitológico y terapéutico adecuado. Sin embargo, en las últimas tres décadas el control se basó casi exclusivamente en el utilización masiva de drogas antihelmínticas de amplio espectro cada vez más eficaces y persistentes. El incremento de la resistencia antihelmíntica junto con las nuevas tendencias de producción orgánica y disminución de los residuos de drogas en los alimentos generó interés en el estudio de nuevas estrategias de control.

En este contexto el presente trabajo de Tesis Doctoral abordó la resistencia antihelmíntica desde un enfoque integrador fármaco-parasitológico, cuyo objetivo fue estudiar la relación que existe entre las concentraciones de diferentes lactonas macrocíclicas en plasma, tejidos/fluidos de localización parasitaria del ovino y en el parásito “blanco” y la eficacia sobre *Haemonchus contortus* resistente. Para ello se dividió la Tesis en 3 secciones experimentales. En la Primera se realizó la caracterización *in vivo* de factores que afectan la relación entre concentraciones en el sitio de localización parasitaria, concentraciones en el parásito “blanco” (*H. contortus*) y eficacia antihelmíntica para diferentes lactonas macrocíclicas en corderos infestados con parásitos resistentes y bajo condiciones estandarizadas. Dentro de esta sección se relizaron 3 experimentos en donde se comparó la utilización de dos vías de administración (subcutánea e intraruminal), las diferentes lactonas macrocíclicas (ivermectina-abamectina-moxidectina) y la duplicación de la dosis como estrategias para aumentar la eficacia antihelmíntica.

Se encontró que si bien la disposición plasmática es mayor al utilizar la vía subcutánea, las concentraciones son mayores en los tejidos y contenidos del tracto gastrointestinal a los 2-3 días post-tratamiento por vía intraruminal y esto produce un efecto relevante cuando se trata de nematodos resistentes, de tal forma que la eficacia contra *H. contortus* fue un 40 % mayor al utilizar la vía intraruminal, coincidentemente con las mayores concentraciones de ivermectina halladas dentro del parásito. Esto demuestra que la incorporación de la droga al parásito por vía

transcuticular es relevante para la eficacia clínica, aún para aquellos parásitos que son hematófagos. En el segundo experimento se encontró que a la dosis terapéutica, moxidectina fue más efectiva frente a nematodos resistentes a ivermectina. Las concentraciones de los 3 fármacos encontradas en los tejidos del tracto gastrointestinal durante los primeros 2 días post tratamiento es relevante para su acción sobre los nematodos resistentes. Sin embargo, a pesar de que moxidectina obtuvo las menores concentraciones acumuladas en los parásitos adultos, el total de parásitos recuperados (al día 2) post tratamiento y su eficacia antihelmíntica fue mayor que la de ivermectina y abamectina. En el tercer experimento, donde se comparó la eficacia y la acumulación de fármacos en los tejidos de los corderos y en el *H. contortus*, utilizando ivermectina y moxidectina a la dosis terapéutica y al doble de la dosis terapéutica, debido al extremo grado de resistencia, sólo la administración de doble dosis de moxidectina fue efectiva.

En la Sección Experimental II, se caracterizó *in vitro* la actividad de las lactonas macrocíclicas contra *H. contortus* resistente, mediante el desarrollo del test de inhibición de motilidad larval utilizando estadios larvarios de *H. contortus*. Esta prueba resultó ser una prueba eficaz para establecer diferencias entre aislamientos susceptibles de resistentes. Sin embargo, es una prueba difícil de implementar para el diagnóstico de resistencia de rutina. También se desarrolló un método *ex vivo*, para caracterizar el ingreso del fármaco dentro de los parasitos adultos. El incremento de la exposición a ivermectina y moxidectina se reflejan como un incremento en la cantidad de droga recuperada en los *H. contortus*.

En la Sección Experimental III se estudiaron los cambios génicos en *H. contortus* asociados al fenómeno de resistencia. Se validó una metodología para cuantificar la expresión de glicoproteína-P2 en aislamientos de *H. contortus* susceptibles y resistentes a LMs. Se encontró una sobreexpresión en los aislamientos de parásitos resistentes. Además, el tratamiento con ivermectina, a diferencia de abamectina y moxidectina, fue el único que indujo un incremento significativo de la expresión de glicoproteína-P2 en los especímenes de *H. contortus* resistentes recuperados de corderos tratados a los 0,5 y 1 días post-tratamiento comparado con los *H. contortus* recuperados de animales sin tratamiento.

Como conclusión, el presente trabajo de Tesis Doctoral a través de estudios *in vivo*, *in vitro* y utilizando herramientas de la biología molecular aporta información que es de utilidad para diseñar

estrategias para prologar la vida útil de las lactonas macrocíclicas siempre que sean usados de manera racional y con una base de evaluación profesional por el veterinario.

Palabras Clave: Gastroenteritis parasitaria, *Haemonchus*, Resistencia antihelmíntica, Ivermectina, Moxidectina, Abamectina, Lactonas Macroçíclicas, Ovinos, Glicoproteína-P.

Abstract

Gastrointestinal parasitic diseases are the main causes of economic losses in livestock. *Haemonchus contortus* infection is undoubtedly the most pathogenic disease that causes the greatest losses in sheep production. The parasite control should be based on management strategies of animals and pastures together with the rational administration of anthelmintics after the appropriate parasitological diagnostic. However, in the last three decades, parasitic control has been based almost exclusively on the massive use of broad-spectrum and persistent anthelmintic drugs. The increase in anthelmintic resistance along with the new tendency of organic production and reduction of drug residues in food generated interest in the study of new control strategies.

In this context, the present work of Doctoral Thesis focused on the anthelmintic resistance from an integrative pharmaco-parasitological approach. The objective of the current work was to study the relationship that exists between the concentrations of different macrocyclic lactones in plasma, tissues / fluids of parasitic location of sheep and in the target parasite and the efficacy against resistant *H. contortus*. The Thesis was divided into 3 experimental sections. In the first, the *in vivo* characterization of factors affecting the relationship between concentrations at the site of parasitic localization, concentrations in the target parasite and anthelmintic efficacy for different macrocyclic lactones in lambs infested with resistant nematodes was evaluated under standardized conditions. Three experiments were carried out within this section, comparing the use of two administration routes (subcutaneous and intra-ruminal), the different macrocyclic lactones (ivermectin-abamectin-moxidectin) and the duplication of the dose as strategies to increase the anthelmintic efficacy.

The results showed that although the plasma disposition is greater after the ivermectin administration by the subcutaneous route, higher drug concentrations were measured in the tissues and contents of the gastrointestinal tract after 2-3 days post-treatment by intraruminal route. The drug increment in the target tissues was reflected in a higher concentrations of ivermectin found within the parasite and a higher efficacy against *H. contortus* after the intraruminal administration. The current results corroborated that the drug entry to the parasite by the transcuticular route is relevant for clinical efficacy, even for those parasites that are hematophagous. In the second experiment, it was found that moxidectin administered at the therapeutic dose was more effective

against nematodes resistant to ivermectin. Although moxidectin showed the lowest accumulated concentrations in adult parasites, lower number of parasites were recovered (at day 2) after moxidectin treatment and its anthelmintic efficacy was greater compared to those obtained after ivermectin and abamectin administration. In the third experiment, the influence of the dose rate on the efficacy and accumulation of drugs in the target tissues of lambs and in *H. contortus* was evaluated. Due to the high level of resistance, only the administration of double dose of moxidectin was effective.

In Experimental Section II, the activity of macrocyclic lactones against resistant *H. contortus* was characterized *in vitro* by the development of the larval motility inhibition test using larval stages of *H. contortus*. This test demonstrated to be an effective test to establish differences between resistant and susceptible isolates. However, it is a difficult test to implement for the routinely diagnostic of anthelmintic resistance. An *ex vivo* method was also developed to characterize the entry of the drug into the adult parasites. The increased exposure to ivermectin and moxidectin enhanced the amount of drug recovered in *H. contortus*.

In Experimental Section III, the genetic changes in *H. contortus* associated with the phenomenon of resistance were studied. The expression of glycoprotein-P2 in susceptible and resistant *H. contortus* isolates was determined. Overexpression was found in isolates of resistant parasites. In addition, treatment with ivermectin, unlike abamectin and moxidectin, was the only one that induced a significant increase in the expression of glycoprotein-P2 in resistant *H. contortus* recovered from treated lambs at 0.5 and 1 day post-administration.

In conclusion, the present Doctoral Thesis validated *in vivo* and *in vitro* studies and molecular tools to improve the parasitic control strategies and to extend the lifespan of macrocyclic lactones. To obtain this in the field, it is necessary the rational use of these drugs in each farm with a previous professional evaluation by the veterinarians.

Keywords: Gastrointestinal parasitic diseases, *Haemonchus contortus*, Anthelmintic resistance, Ivermectin, Moxidectin, Abamectin, Macrocyclic lactones, Sheep, P-glycoprotein.

Abreviaturas

ABM: Abamectina

ARN: Ácido ribonucleíco

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AVM: Avermectinas

BZs: Bencimidazoles

DRM: Doramectina

GluCl: Canales de cloro ligados a glutamato

Gp-P: Glicoproteína -P

IVM: Ivermectina

L1: Larva 1

L2: Larva 2

L3: Larva 3 (Larva infestante)

LEV: Levamisol

LMS: Lactonas Macroclícas

MBM: Milbemicinas

PGI: Parasitosis Gastrointestinal

RA: Resistencia antihelmíntica

TDL: Test de Desarrollo Larval

TEC: Test de Eficacia controlada

TEH: Test de Eclosión de Huevos

TGI: Tracto Gastrointestinal

TIAL: Test de Inhibición de la Alimentación Larval

TIML: Test de Inhibición de la Motilidad Larval

TRCH: Test de Reducción del Conteo de Huevos

Índice

Capítulo I

Introducción

1.1. Parasitosis gastrointestinal.....	1
1.1.1. Control de la parasitosis gastrointestinal.....	5
1.1.2. Características farmacológicas de las Lactonas macrocíclicas.....	5
1.2. Resistencia antihelmíntica.....	9
1.2.1. Detección de la Resistencia antihelmíntica.....	13
1.2.2. Pruebas <i>in vivo</i>	13
1.2.3. Pruebas <i>in vitro</i>	14
1.2.4. Pruebas de Biología molecular.....	15
1.3. Hipótesis general.....	17
1.4. Objetivo general.....	17

Capítulo II

Desarrollo metodológico

2.1. Metodología experimental.....	19
2.2. Cuantificación de fármacos.....	19
2.2.1. Químicos.....	19
2.2.2. Preparación de estándares.....	19
2.2.3. Preparación de muestras, procedimiento de extracción y análisis por HPLC.....	20
2.2.4. Análisis farmacocinético.....	22
2.2.5. Análisis estadístico.....	23
2.3. Análisis parasitológico.....	23
2.3.1. Test de reducción del conteo de huevos (TRCH).....	23

2.3.2. Test de eficacia controlada (TEC).....	24
2.3.3. Anàlisis estadístico.....	25
2.4. Test <i>in vitro</i> de inhibición de la motilidad larval (TIML).....	25
2.4.1. Prueba de inhibición de la motilidad larval.....	26
2.4.2. Anàlisis estadístico.....	27
2.5. Test <i>in vitro</i> con especímenes adultos de <i>H. contortus</i>	28
2.5.1. Medición de la acumulación de IVM y MXD en <i>H. contortus</i>	28
2.5.2. Anàlisis estadístico.....	28
2.6. Expresión de transportadores proteicos en <i>H. contortus</i>	29
2.6.1. Aislamiento y cuantificación de ARN.....	29
2.6.2. Transcripción reversa.....	29
2.6.3. PCR en Tiempo real.....	30
2.6.3.a. Validación de la eficiencia de la PCR en Tiempo real.....	31
2.6.4. Anàlisis estadístico.....	31
2.7. Bienestar animal.....	31

Capítulo III

Sección Experimental I

Caracterización *in vivo* de factores que afectan la relación entre la concentración en el sitio de localización parasitaria, la concentración en el parásito “blanco” y la eficacia antihelmíntica para diferentes LMs.

3.1. Introducción.....	32
3.2. Hipótesis y objetivos particulares.....	33
3.3. Desarrollo experimental.....	34
3.3.1. Criterios de inclusión y exclusión.....	34
3.3.2. Asignación de animales a los grupos experimentales.....	35

3.4. Experimento 1: Relación entre la oncentración de IVM en tejidos de localización parasitaria y en <i>H. contortus</i> y la eficacia antihelmíntica:	
Efecto de la vía de administración.....	35
3.4.1. Animales experimentales y tratamiento.....	35
3.4.2. Toma de muestras.....	36
3.4.3. Resultados.....	37
3.4.3.a. Pesos y carga parastaria inicial.....	37
3.4.3.b. Resultados del conteo de HPG y TRCH.....	37
3.4.3.c. Coprocultivos.....	38
3.4.3.d. Conteo de parásitos adultos del TGI y TEC.....	40
3.4.3.e. Validación de métdos cromatográficos de IVM en plasma, Tejidos Gastrointestinales y parásitos.....	46
3.4.3.f. Cinética plasmática de IVM.....	50
3.4.3.g. Concentraciones de IVM en el TGI y en <i>H. contortus</i>	53
3.5. Experimento 2: Evaluación fármaco-parasitológica de la actividad antihelmíntica diferencial de IVM, ABM y MXD contra aislamientos de parásitos resistentes de ovinos.....	57
3.5.1. Animales experimentales y Tratamiento.....	58
3.5.2. Toma de muestras.....	58
3.5.3. Resultados.....	59
3.5.3.a. Pesos y carga parastaria inicial.....	59
3.5.3.b. Resultados del conteo de HPG y TRCH.....	59
3.5.3.c. Coprocultivos.....	60
3.5.3.d. Conteo de parásitos adultos del TGI y TEC.....	63

3.5.3.e. Validación de métodos cromatográficos de LMs en plasma, Tejidos Gastrointestinales y parásitos.....	68
3.5.3.f. Cinética plasmática de LMs.....	71
3.5.3.g. Concentraciones de LMs en el TGI y en <i>H. contortus</i>	74
3.6. Experimento 3: Influencia de la dosis sobre la farmacocinética y la farmacodinamia de MXD e IVM en corderos infestados con poblaciones de parásitos gastrointestinales resistentes.....	79
3.6.1. Animales experimentales y Tratamiento.....	79
3.6.2. Toma de muestras.....	80
3.6.3. Resultados.....	81
3.6.3.a. Pesos y carga parastaria inicial.....	81
3.6.3.b. Resultados del conteo de HPG y TRCH.....	81
3.6.3.c. Coprocultivos.....	83
3.6.3.d. Conteo de parásitos adultos del TGI y TEC.....	85
3.6.3.e. Validación de métodos cromatográficos de LMs en plasma, tejidos gastrointestinales y parásitos.....	96
3.6.3.f. Cinética plasmática de IVM y MXD.....	96
3.6.3.g. Concentraciones de IVM y MXD en el TGI y en <i>H. contortus</i>	101

Capítulo IV

Sección Experimental II

Caracterización *in vitro* de la actividad de las LMs contra *H. contortus* resistente

4.1. Introducción.....	108
4.2. Hipótesis y Objetivos específicos.....	109
4.3. Desarrollo experimental.....	110

4.3.1. Experimento 1: Test de Inhibición de la migración larval (TIML).....	110
4.3.1.a. Estandarización de la prueba.....	110
4.3.1.b. Caracterización <i>in vitro</i> de la actividad de IVM contra aislamientos de poblaciones susceptibles y resistentes de <i>H. contortus</i>	115
4.3.2. Experimento 2: Test <i>in vitro</i> con especímenes de parásitos adultos: medición de la acumulación de IVM y MXD en <i>H. contortus</i>	118

Capítulo V

Sección Experimental III

Estudio de la expresión de Glicoproteína-P2 en *H. contortus* resistente a Lactonas macrocíclicas

5.1. Introducción.....	121
5.2. Hipótesis y Objetivos específicos.....	121
5.3. Desarrollo experimental.....	122
5.3.1. Validación del método y cuantificación relativa de la glicoproteína P2 por PCR en Tiempo real.....	122
5.4. Experimento 1: Evaluación de la expresión de Gp-P2 en aislamientos resistentes y susceptibles de <i>H. contortus</i>	124
5.4.1. Animales experimentales.....	124
5.4.2. Toma de muestra.....	125
5.4.3. Resultados.....	125
5.4.3.a Cuantificación relativa de Gp-P2 en <i>H. contortus</i> resistente y susceptible.....	125
5.5. Experimento 2: Efecto del tratamiento con diferentes LMs sobre la expresión De Gp-P2.....	126
5.5.1. Animales experimentales y tratamiento.....	126

5.5.2. Toma de muestras.....	127
5.5.3. Resultados.....	127
Capítulo VI	
Discusión General	
6.1. Caracterización <i>in vivo</i> de factores que afectan la relación entre la farmacocinética y farmacodinamia de las LMs.....	131
6.1.1. Efecto de la vía de administración.....	131
6.1.2. Evaluación fármaco-parasitológica <i>in vivo</i> de la actividad antihelmíntica diferencial de las LMs.....	140
6.1.3. Efecto de la dosis sobre la farmacocinética y la farmacodinamia de IVM y MXD.....	144
6.2. Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de las LMs contra <i>H. contortus</i> resistente.....	147
6.3. Estudio de la expresión de la Gp-P2 en <i>H. contortus</i> resistente.....	152
Capítulo VII	
Conclusiones e Impacto de los resultados.....	160
Capítulo VIII	
Producción científica surgida de este trabajo de Tesis.....	161
8.1. Artículos Completos.....	161
8.2. Comunicaciones a Congresos.....	162
Capítulo IX	
Referencias Bibliográficas.....	164

Índice de Tablas

TABLA 1: Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) expresado como media aritmética y amplitud, porcentaje de reducción del HPG (TRCH) e intervalo de confianza del 95 % (IC 95 % I-S), al día 0 y 15 post tratamiento para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR).....	37
TABLA 2: Comparación del HPG entre los diferentes grupos experimentales (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) a los 3, 9 y 15 días post tratamiento, media aritmética del conteo de HPG y porcentaje de reducción del HPG.....	38
TABLA 3: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR), al día 3 post-tratamiento.....	39
TABLA 4: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR), al día 9 post-tratamiento.....	39
TABLA 5: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR), al día 15 post-tratamiento.....	40
TABLA 6: Media geométrica y aritmética, amplitud y eficacias calculadas con ambas medias para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR), en el total de parásitos del tracto gastrointestinal.....	41
TABLA 7: Media geométrica de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.....	42

TABLA 8: Media aritmética de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.....	43
TABLA 9: Media geométrica, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) en el total de parásitos adultos del intestino en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	44
TABLA 10: Media aritmética, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) en el total de parásitos adultos del intestino en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	45
TABLA 11: Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración SC e IR de ivermectina (IVM) a ovinos a razón de 0,2 mg/kg.....	53
TABLA 12: Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) expresado como media aritmética y amplitud, porcentaje de reducción del HPG (TRCH), intervalo de confianza (IC 95%), al día 9 y 15 post tratamiento para los grupos (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR)	60
TABLA 13: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM), al día 3 post-tratamiento.....	61
TABLA 14: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM), al día 9 post-tratamiento.....	62
TABLA 15: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM), al día 15 post-tratamiento.....	62
TABLA 16: Media geométrica y aritmética, amplitud, eficacia para cada grupo	

(CONTROL, MXD, ABM e IVM), en el total de parásitos del tracto gastrointestinal.....	63
TABLA 17: Media geométrica de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.....	64
TABLA 18: Media aritmética de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.....	65
TABLA 19: Media geométrica, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	66
TABLA 20: Media aritmética, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	67
TABLA 21: Promedio de los parámetros farmacocinéticos plasmáticos obtenidos luego de la administración intraruminal de MXD, ABM e IVM a razón de 0,2 mg/kg.....	73
TABLA 22: Concentraciones y desvíos estándar de moxidectina MXD, ABM e IVM en las mucosas abomasal e intestinal a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento.....	75
TABLA 23: Concentraciones y desvíos estándar de MXD, ABM e IVM en los contenidos abomasal e intestinal a los 0,5; 1 y 2 días post tratamiento.....	76
TABLA 24: Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) expresado como media aritmética y amplitud, porcentaje de reducción del HPG (TRCH), intervalo de confianza al 95 % (IC 95 %), al día 0 y 15 post-tratamiento para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 E IVM-0,4).....	82

TABLA 25: Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) expresado como media aritmética y amplitud, porcentaje de reducción del HPG (TRCH), intervalo del 95% de confianza (IC 95%), al día 0 y 15 post-tratamiento para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 E MXD-0,4).....	83
TABLA 26: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4), al día 15 post-tratamiento.....	84
TABLA 27: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4), al día 15 post-tratamiento.....	85
TABLA 28: Media geométrica y aritmética, amplitud, eficacias geométrica y aritmética para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4), en el total de parásitos del tracto gastrointestinal.....	86
TABLA 29: Media geométrica de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.....	87
TABLA 30: Media aritmética de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.....	88
TABLA 31: Media geométrica, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	89
TABLA 32: Media aritmética, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	90

TABLA 33: Media geométrica y media aritmética, amplitud y eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4), en el total de parásitos del tracto gastrointestinal.....	91
TABLA 34: Media geométrica de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.....	92
TABLA 35: Media aritmética de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.....	93
TABLA 36: Media geométrica, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	94
TABLA 37: Media aritmética, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4) en el total de parásitos adultos del delgado y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	95
TABLA 38: Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración intraruminal de ivermectina a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4) a ovinos.....	98
TABLA 39: Parámetros farmacocinéticos (\pm DE) obtenidos luego de la administración IR de MXD a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4) a ovinos.....	100

TABLA 40: Media aritmética (\pm DE) de la concentración de ivermectina (IVM) en plasma (ng/ml), mucosas y contenidos gastrointestinales (ng/g) y *H. contortus* (ng/g) al día 1 post-administración de IVM por vía IR en ovinos a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) Y 0,4 mg/kg (IVM-0,4).....101

TABLA 41: Promedio (\pm DE) de la concentración de moxidectina (MXD) en plasma (ng/ml), mucosas y contenidos gastrointestinales (ng/g) y *H. contortus* (ng/g) al día 1 post-administración de MXD por vía intraruminal (IR) en ovinos a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) 0,4 mg/kg (MXD-0,4).....105

TABLA 42: Parámetros obtenidos del análisis de las curvas dosis respuesta obtenidas de las pruebas de inhibición de la migración larval de IVM sobre aislamientos de *H. contortus* proveniente de poblaciones susceptible y resistente.....118

Índice de Figuras

FIGURA 1: Ciclo biológico de <i>H. contortus</i> . A: abomaso, B: huevo y C: rumen.....	4
FIGURA 2: Corridas cromatográficas típicas de ivermectina (IVM) obtenidas luego de la extracción físico-química desde diferentes matrices biológicas. ABM: abamectina	47
FIGURA 3: Curva de calibración obtenida para ivermectina (IVM) en plasma.....	48
FIGURA 4: Curva de calibración obtenida para ivermectina (IVM) en mucosas gastrointestinales	49
FIGURA 5: Perfil de concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de ivermectina (IVM) luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg en ovinos.....	51
FIGURA 6: Concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de ivermectina (IVM) luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg en ovinos obtenidos entre los 5 y los 15 días post-administración.	52
FIGURA 7: Relación entre las concentraciones promedio de ivermectina (IVM) obtenidas al día 3 post-administración en el contenido abomasal y en la mucosa luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0,2 mg/kg).....	55
FIGURA 8: Relación entre las concentraciones promedio de ivermectina (IVM) obtenidas al día 3 post-administración en el contenido intestinal y en la mucosa luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0,2 mg/kg).....	56

FIGURA 9: Concentraciones de ivermectina (IVM) en <i>H. contortus</i> tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0,2 mg/kg) en ovinos. El inserto muestra la correlación obtenida entre las concentraciones de droga en el parásito y las obtenidas en el contenido abomasal.	57
FIGURA 10: Corridas cromatográficas típicas de moxidectina (MXD) abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) luego de la extracción físico-química desde diferentes matrices biológicas. DRM: doramectina (estándar interno).....	68
FIGURA 11: curva de calibración obtenida para moxidectina (MXD) en las mucosas gastrointestinales.....	70
FIGURA 12: curva de calibración obtenida para abamectina (ABM) en las mucosas gastrointestinales.....	70
FIGURA 13: curva de calibración obtenida para ivermectina (IVM) en las mucosas gastrointestinales.....	71
FIGURA 14: Concentraciones plasmáticas promedio y desvíos estándar de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) en función del tiempo luego de su administración por vía oral en corderos.....	72
FIGURA 15: Comparación del tiempo medio de residencia (TMR) y desvíos estándar obtenidos para moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM).....	74
FIGURA 16: Concentraciones de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) en contenido abomasal y contenido intestinal a los 0,5; 1 y 2 días post-administración.....	77
FIGURA 17: Concentraciones de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) en <i>H. contortus</i> a los 0,5; 1 y 2 días post-administración.....	78

FIGURA 18: Masa total de especímenes de <i>H. contortus</i> recuperados a los 0,5; 1 y 2 días post- tratamiento con moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM).....	79
FIGURA 19: Perfil de concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de ivermectina (IVM) tras su administración por vía IR a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4) en ovinos.....	97
FIGURA 20: Perfil de concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de MXD luego de su administración por vía IR a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4) en ovinos.....	99
FIGURA 21: Concentraciones de ivermectina (IVM) obtenidas en <i>H. contortus</i> , contenido abomasal y plasma, luego del tratamiento por vía IR a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4) en ovinos.....	102
FIGURA 22: Correlación obtenida entre las concentraciones medias de ivermectina (IVM) obtenidas al día 1 post-administración entre <i>H. contortus</i> y el contenido abomasal luego de su administración por vía IR.	103
FIGURA 23: Concentraciones de ivermectina (IVM) (\pm DE) obtenidas en contenido intestinal, luego del tratamiento por vía intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4) en ovinos.....	104
FIGURA 24: Concentraciones de moxidectina (MXD) (\pm DE) obtenidas en <i>H. contortus</i> , contenido abomasal y plasma, a 1 día post-tratamiento por vía intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4) en ovinos.....	106

FIGURA 25: Correlación obtenida entre las concentraciones promedio de moxidectina (MXD) obtenidas al día 1 post-administración entre <i>H. contortus</i> y la concentración en el contenido abomasal luego de su administración por vía intraruminal (IR).	107
FIGURA 26: Concentraciones de moxidectina (MXD) (\pm DE) obtenidas en contenido intestinal, luego del tratamiento por vía intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4) en ovinos.....	108
FIGURA 27: Sistema de migración. Ampliado: sistema de filtro para migración.....	112
FIGURA 28: Porcentaje promedio de migración larval de los aislamientos de poblaciones de <i>H. contortus</i> susceptible y resistente incubados a diferente temperatura.....	113
FIGURA 29: Porcentaje promedio de migración larval de los aislamientos de poblaciones de <i>H. contortus</i> susceptible y resistente con y sin desenvainamiento.....	113
FIGURA 30: Porcentaje promedio de migración larval de los aislamientos de poblaciones de <i>H. contortus</i> susceptible y resistente con diferentes sustratos de migración (agua y/o agar).....	114
FIGURA 31: Porcentaje promedio de migración larval de los aislamientos de poblaciones de <i>H. contortus</i> susceptible y resistente con diferente orden de incorporación de los componentes al sistema.....	114
FIGURA 32: Actividad de ivermectina (IVM) expresada como porcentaje de inhibición de la motilidad larval en aislamientos de <i>H. contortus</i> proveniente de una población susceptible. Concentraciones expresadas como Log en M.....	115

FIGURA 33: Actividad de ivermectina (IVM) expresada como porcentaje de inhibición de la motilidad larval en aislamientos de <i>H. contortus</i> proveniente de una población resistentes. Concentraciones expresadas como Log en M.....	116
FIGURA 34: Actividad de la IVM expresada como porcentaje de inhibición de la migración larval en aislamientos de <i>H. contortus</i> (HC) provenientes de poblaciones susceptibles versus resistentes (concentraciones en M). Cada curva representa el promedio de 4 repeticiones de pruebas completas	117
FIGURA 35: Acumulación de ivermectina (IVM) y moxidectina (MXD) en especímenes adultos de <i>H. contortus</i> luego de su incubación a 0,5 μ M y 5 μ M.....	119
FIGURA 36: Acumulación de ivermectina (IVM) y moxidectina (MXD) en especímenes adultos de <i>H. contortus</i> luego de su incubación durante 15 minutos y 3 horas a 0,5 μ M.....	120
FIGURA 37: Curvas de validación de la expresión de Actina y Gp-P2, expresado como Ct en función de la concentración de ADNc (log).....	123
FIGURA 38: Curva de regresión y coeficiente de determinación de los valores de Delta Ct (Ct del gen Gp-P2 - Ct del gen Actina) en función de la concentración de ADNc (log ng). Cada punto representa el promedio para cada concentración.....	124
FIGURA 39: Expresión relativa de la Glicoproteína-P2 (Gp-P2) en especímenes adultos de <i>H. contortus</i> resistente y susceptible recuperados de corderos sin tratamiento.	126
FIGURA 40: Expresión relativa de Gp-P2 en especímenes adultos de <i>H. contortus</i> resistente recuperados de corderos sin tratamiento (CONTROL) y de corderos tratados por vía IR con ivermectina (IVM) (0,2 mg/kg) a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento	128

FIGURA 41: Expresión relativa (promedio \pm DE) de la glicoproteína-P2 (Gp-P2) en especímenes adultos de *H. contortus* resistente recuperados de corderos sin tratamiento (CONTROL) y de corderos tratados por vía IR con abamectina (ABM) (0,2 mg/kg) a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento..... 129

FIGURA 42: Expresión relativa (promedio \pm DE) de la glicoproteína-P2 (Gp-P2) en especímenes adultos de *H. contortus* resistente recuperados de corderos sin tratamiento (CONTROL) y de corderos tratados por vía IR con moxidectina (MXD) (0,2 mg/kg) a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento..... 130

FIGURA 43: Influencia de la vía de administración de IVM en el tratamiento de nematodos gastrointestinales resistentes en rumiantes.....139

FIGURA 44: Relación entre las lactonas macrocíclicas (LMs) y la glicoproteína-P (Gp-P) en el hospedador y en el parásito.....157

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1.1. Parasitosis Gastrointestinal

La parasitosis gastrointestinal (PGI) es una enfermedad de carácter enzootico, de curso generalmente crónico y mortalidad baja. Es causada por la presencia de un gran número de nematodos gastrointestinales en el abomaso e intestino de los rumiantes que les genera una reducción en la ganancia de peso vivo, anemia, y en algunos casos, la muerte. La PGI está caracterizada clínicamente por alteraciones gastrointestinales como diarrea, retraso del crecimiento, disminución en la producción y en casos más severos anemia y edema submandibular (Urquhart *et al.* 1996; Taylor *et al.* 2007).

En la actualidad, la PGI continúa siendo una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción pecuaria con un rango muy amplio de costos asociados a la enfermedad tanto desde el punto de vista del productor como de los animales. La mortalidad por parásitos constituye la forma más extrema de reducir la productividad, sin embargo, las pérdidas clínicas y subclínicas generadas por una reducción en la producción de lana, carne y leche de los animales, como así también la afección directa o indirecta de las crías, son de fundamental importancia en los sistemas pastoriles; sin dejar de tener en cuenta la reducción en el nivel de bienestar de los animales (Taylor *et al.* 2007; Nari y Fiel, 1994). Las pérdidas causadas por mortandades ascienden a un 50 % en regiones subtropicales, como en la Mesopotamia y en Uruguay (Castells *et al.*, 1995) y se estima que luego de un brote de haemonchosis aguda, los animales sobrevivientes pierden entre 250 y 500 g del peso del vellón sucio y entre 3 a 5 kg de carne promedio por animal (Suárez *et al.*, 2007). En la pampa húmeda, las mortandades superan el 20 % con pérdidas en la ganancia de peso y en el vellón del orden del 28 y 8 % respectivamente (Fiel *et al.*, 1991). El avance y consolidación de la resistencia a los antihelmínticos ha introducido una variable muy importante en el control de la enfermedad. En este contexto donde los parásitos, el sistema de producción y las herramientas de diagnóstico y control son primordiales, los efectos de la enfermedad son muy variables para cada sistema productivo (Fiel y Nari, 2013).

El origen etiológico de la PGI en ovinos está dado por la infección individual, o más generalmente mixta de los parásitos nematodos *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei*, *Ostertagia ostertagi*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus* spp, *Nematodirus* spp, *Cooperia* spp, *Strongyloides papillosus*, *Oesophagostomum venulosum*, *Trichuris ovis* y *Dictyocaulus filaria*. En las regiones de clima frío *T. circumcincta* es la principal causa de PGI, sin embargo en las regiones de clima templado y subtropical *H. contortus* cumple un papel predominante (Romero, 2007).

La haemonchosis es una enfermedad marcadamente estacional, en los meses de febrero, marzo, abril y mayo se presentan la mayor parte de los brotes, época que coincide con el post destete y siendo los corderos la categoría más susceptible. Las primeras heladas determinan una caída brusca en la tasa de contaminación de las pasturas ya que los huevos y larvas resultan poco viables si son sometidos a temperaturas bajas (Soulsby, 1988; Sánchez y Romero, 2005), y las larvas de 4to estadio entran en un período de hipobiosis como alternativa de mantenimiento durante los meses invernales. En la Pampa húmeda esta inhibición no supera al 40 % de las larvas y dura de 8 a 12 semanas. La menor tasa de infestación por esta especie se presenta en los meses de julio y agosto (Romero, 2007).

H. contortus es una de las especies más patógenas, por su alta capacidad reproductiva y por ser hematófago, por lo que pueden producir la muerte de corderos en pocos días. Se localiza en el abomaso de los rumiantes y de allí deriva su denominación “gusano del cuajo”. Son parásitos relativamente grandes (19 a 35 mm de largo), los machos son de color rojo, mientras que las hembras presentan el ovario blanquecino enrollado sobre el intestino dándole aspecto de “palo de barbero” (Lapage, 1962; Soulsby, 1988). Los adultos penetran hasta el fondo de las glándulas del abomaso, lesionando la mucosa para succionar sangre. La acción oportunista que ejerce es por su característica de hematófago ya que se calcula que el consumo diario de sangre es de 0,05 ml por gusano por día, esto explica en parte la anemia tan marcada que causan las infestaciones por este nematodo (Taylor *et al.* 2007). La acción mecánica es de poca importancia dado el tamaño en relación con la luz gástrica. La acción tóxica es generada por sustancias anticoagulantes que infiltra en los tejidos alrededor de la pequeña úlcera que ocasiona para succionar sangre; al cambiar de sitio de alimentación, la úlcera continua sangrando, lo que favorece la pérdida de sangre; ocasionando signos clínicos y mortalidad (Quiroz, 1984). La haemonchosis se presenta en tres etapas, una primera aguda en la que los animales presentan anemia aguda y puede llevar a la muerte, una segunda subaguda en la que hay una eritropoyesis compensatoria y una tercera crónica, con un

agotamiento de las reservas y los sistemas de compensación. La primera, se presenta cuando las características climáticas son muy favorables por ejemplo veranos lluviosos y otoño, en cambio los veranos secos seguidos de inviernos muy fríos, frenan el desarrollo de la enfermedad (Fiel y Nari, 2013).

El ciclo de vida de *H. contortus* es directo y típico de los nematodos *Trichostrongilídeos* con una fase de desarrollo sobre el hospedador (relación parásito-animal) y otra libre (relación parásito-medio ambiente) (Figura 1). La fase de vida libre o externa comienza cuando los huevos de los parásitos caen junto con las heces de los animales infectados al suelo. Bajo condiciones apropiadas de humedad, temperatura y aireación comienzan a evolucionar a través varios estadios dando origen al primer estadio larvario (L1) que eclosiona y abandona el huevo. La L1 muda a L2 que tras una nueva muda se convierte en L3 o infestante. La larva infestante mantiene la cutícula de la L2 y desarrolla por fuera otra cutícula, que si bien le impide alimentarse, le confiere resistencia a las condiciones ambientales. La supervivencia de estas larvas dependerá de la energía acumulada en sus células intestinales y su resistencia a las adversidades climáticas. Finalmente, cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables, la L3 abandona las heces y migra por la pastura, permaneciendo allí hasta que son ingeridas por el hospedador, iniciándose así el ciclo interno (Soulsby, 1988; Nari y Fiel, 1994; Entrocasso, 1988).

El período de desarrollo desde la fase de huevo hasta la formación de las larvas infestantes, constituye la fase pre-parásita del ciclo. En condiciones óptimas de temperatura (22-25°C) y humedad (60-70%), el tiempo necesario para la formación de larvas infestantes oscila entre los 3 y 14 días (Soulsby, 1988).

El ciclo interno comienza cuando los animales ingieren pastos contaminados con larvas infestantes. Estas se desprenden de su envoltura externa en el rumen (parásitos abomasales). Tras la liberación de la cutícula, las larvas comienzan una fase histotropa, en la que migran a través de la mucosa penetrándola más o menos profundamente. Allí realizan la segunda muda a L4, entre el 2º y el 8º día post-infestación. Después de unos días de crecimiento en la mucosa, maduran rápidamente emergiendo a la luz del abomaso o intestino, convirtiéndose en adultos. Copulan y las primeras hembras grávidas comienzan a poner huevos que son eliminados con las heces. El tiempo transcurrido desde la infestación hasta la eliminación de huevos en las heces se denomina período de

prepatencia y en general, para el conjunto de los *Trichostrongilideos* tiene una duración aproximada de 16 a 21 días (Soulsby, 1988; Nari y Fiel, 1994).

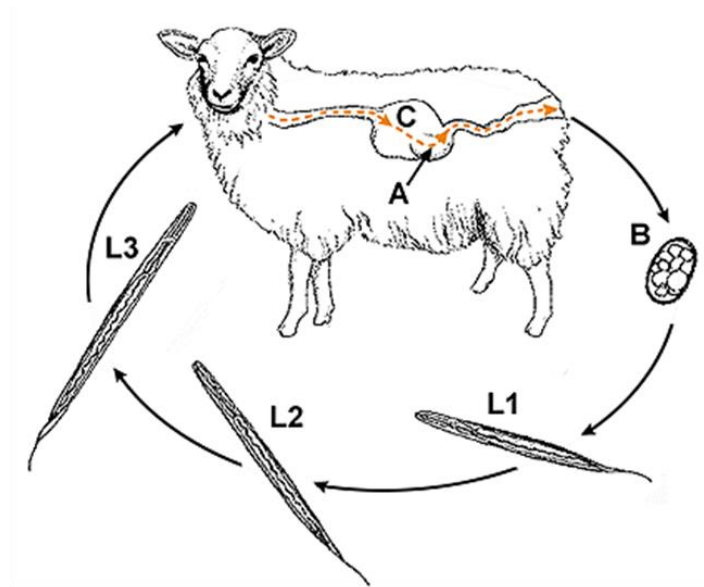


FIGURA 1: Ciclo biológico de *H. contortus*. A: abomaso, B: huevo y C: rumen (Johnstoner, 1998)

Las características del ciclo biológico determinan la importancia epidemiológica del ciclo externo o de vida libre, que establece el patrón de contaminación e infestividad de las pasturas. En la provincia de Buenos Aires, la producción de ovinos está reducida a majadas de consumo, que frecuentemente pastorean praderas utilizadas primariamente por bovinos, por lo que las condiciones de riesgo por la infestación de las pasturas son marcadamente menores que en otras zonas de mayor densidad ovina y clima mas apropiado como la región mesopotámica. Además, los ovinos son susceptibles a las parasitosis durante toda su vida, aumentando el riesgo de algunas categorías como corderos, borregos diente de leche y ovejas durante el parto y la lactación. Estas últimas constituyen la base de la contaminación de las pasturas que afectaran a los corderos actuando como pie de infestación y propagación de las parasitosis (Romero *et al.*, 2007). Por otro lado, debido al alto potencial biótico de *Haemonchus spp.* asociado a condiciones climáticas favorables (temperaturas elevadas y humedad) la contaminación de la pastura es rápida y puede ocasionar cuadros clínicos agudos (Fiel y Nari, 2013).

1.1.1. Control de las PGI

El control de las PGI debe programarse integral y racionalmente sobre la base de la epidemiología y bioecología de los parásitos. Un programa de control eficaz consiste en la planificación de acciones que incluyen diversas estrategias de manejo de los animales y las pasturas, junto con la administración de antihelmínticos, luego del diagnóstico parasitológico y terapéutico adecuado para cada unidad productiva. A pesar de ello, en las últimas tres décadas el control se ha basado casi exclusivamente en el utilización masiva de drogas antihelmínticas de amplio espectro cada vez más eficaces y persistentes. El objetivo de los tratamientos es prevenir la enfermedad clínica o subclínica y al mismo tiempo reducir algunos de los costos asociados a la PGI, mientras que permite el desarrollo de la inmunidad natural (Urquhart *et al.* 1996; Suárez, 2007; Molento, 2009). El incremento de la resistencia antihelmíntica junto con las nuevas tendencias de producción orgánica y la concientización sobre los residuos de drogas en la cadena alimentaria ha generado interés en las estrategias de control que no están basadas solamente en el uso de antihelmínticos. Sin embargo ninguna de las estrategias propuestas ofrecen una alternativa efectiva ante los antihelmínticos (Wolstenholme *et al.* 2004; Lanusse *et al.* 2013).

Todas las estrategias actuales de control de las PGI están basadas en la utilización racional de los antihelmínticos. Hasta hace unos años, solo existían tres familias de grupos químicos de antihelmínticos de amplio espectro disponibles comercialmente: los bencimidazoles (BZs); levamisol y otros imidazotiazoles (LEV) y las lactonas macrocíclicas (LMs). Recientemente se han incorporado dos nuevas clases de drogas, los derivados del aminoacetoniitrilo (monepantel) y los derivados de la paraherquamida (derquantel). Teniendo en cuenta que las LMs son los fármacos bajo estudio en este trabajo de tesis se describen a continuación sus principales características.

1.1.2. Características farmacológicas de las LMs

El grupo de las LMs es uno de los más utilizados en el control de la enfermedad parasitaria en rumiantes. IVM fue aislada de un hongo ubicuo, *Streptomyces avermitilis* en 1974 y se introdujo al mercado farmacéutico veterinario en 1981 (Geary, 2005). A diferencia de las drogas existentes en esos momentos IVM presentaba altos niveles de potencia farmacológica, actividad de amplio espectro, buena persistencia y la posibilidad de utilizarla por diferentes vías de administración (Geary, 2005). Sumado a estas características, presentaba una eficacia de casi el 100 %, por lo tanto

fue el fármaco más vendido contra endo y ectoparásitos de rumiantes y revolucionó la industria de la sanidad animal (Crump y Otoguro, 2005; Van Zeveren, 2009).

Las LMs se dividen en dos grandes familias según su procedencia: avermectinas (AVM) y milbemicinas (MBM). La primera familia deriva del *S. avermitilis* y está compuesta por: abamectina (ABM), ivermectina (IVM), doramectina (DRM), eprinomectina (EPM) y selamectina (SLM). La segunda familia, MBM, derivan del *S. cyanogriseus* y *S. hydrocopicus* y está compuesta por nemadectina (NMD), moxidectina (MXD), milbemicina (MBM) y MBM 5 oxima. La estructura química compleja de estos fármacos es común a todas las LMs y consiste en una lactona macrocíclica, unida a un grupo benzofurano (C₂ a C₈) y a un anillo espiroquetal (C₁₇ a C₂₅) en un arreglo tridimensional, que es reconocido en forma específica por los receptores de los canales de cloro. Son moléculas de gran tamaño con un peso molecular entre 600 kd y 900 kd (MBM y AVM respectivamente). Las MBM se diferencian de las AVM por no poseer un disacárido como sustituyente en el C₁₃ en el anillo lactónico. Se han identificado 8 componentes del producto de la fermentación del *S. avermitilis*: 4 componentes recuperados en mayor proporción y (A_{1a}, A_{2a}, B_{1a}, B_{2a}) y 4 productos recuperados en menor proporción (A_{1b}, A_{2b}, B_{1b}, B_{2b}). Solo ABM es el derivado natural del hongo (AVM B_{1a}) e IVM es un derivado semisintético de la AVM B_{1a}, que contiene un 80 % de 22,23- dihidroavermectina B_{1a} y no más de un 20 % de 22,23 dihidroavermectina B_{1b} (Fisher y Mrozik, 1992). El MXD (23-O-metiloxima-nemadectin) es un compuesto natural producido por *S. cyaneogriseus*, al igual que las otras MBM es aglicosilado por la pérdida de una fracción bis- oleandrosil en la posición 13, además de estar protonado en esta misma posición en contraste de las AVM que están hidroxiladas en esta posición. Estas últimas también tienen un grupo etilo o metilo en la posición 25 y pueden diferir de otras MBM en la sustitución de la posición 5 y 25. Particularmente el MXD presenta una cadena lateral oleofínica en la posición 25 y una fracción metaoxima en la posición 23. Ambas características son específicas de esta droga y no se encuentran en otras MBM o AVM (Lespine *et al.* 2007; Ardelli *et al.* 2009; Prichard, *et al.* 2012).

Las LMs son fármacos de elevada liposolubilidad, solubles en la mayoría de los solventes orgánicos pero escasamente solubles en agua y son sensibles a la luz ultravioleta (Fisher y Mrozik, 1992). Si bien todas las LMs comparten algunas propiedades físico-químicas propias del grupo, las pequeñas diferencias entre las AVM y MBM, pueden determinar cambios en el comportamiento farmacocinético de estas drogas, lo cual impacta sobre la eficacia y persistencia antiparasitaria de las

mismas (Lifschitz, 2000a). Comparado a la IVM, MXD es más lipofílico, lo que le permite ser absorbido más rápido y con mayor persistencia en los tejidos del hospedador (Lifschitz *et al.* 2010a).

Las LMs llevan a cabo su acción antiparasitaria incrementando la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que causa hiperpolarización y parálisis flácida de células musculares somáticas y faríngeas, permitiendo la inmovilización y emaciación de los parásitos (Blackhall *et al.* 1998; 2003; Prichard y Roulet, 2007). La identificación del receptor específico ha sido motivo de controversias, pero en la actualidad se asume que las LMs se unen en forma irreversible a la subunidad específica de los canales de cloro que liga al glutamato (GluCl), abriendo de esta manera dichos canales en la membrana plasmática, permitiendo el ingreso de cloro y como consecuencia causando hiperpolarización. La afinidad por los receptores de cada uno de los compuestos de este grupo químico, determina características diferenciales en la actividad antiparasitaria (Martin, 1997; Prichard *et al.* 2012). La falta de actividad de las LMs sobre trematodos y cestodos se debe a la ausencia, o al menos a la menor trascendencia, de la transmisión mediada por ese tipo de canales de cloro en la coordinación neuromuscular de estos parásitos, en comparación con los nematodos o artrópodos. Por otro lado, en mamíferos no han sido reportados los canales de cloro ligados al glutamato siendo esta otra causa de selectividad y baja toxicidad de estas drogas en mamíferos (Mc Kellar y Benchaoui, 1996).

Las LMs tienen un amplio espectro de acción sobre parásitos internos y externos de bovinos, ovinos, equinos y cerdos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no tienen actividad antiparasitaria *in vivo* contra cestodos y trematodos, basado en la falta de sitios de unión específicos en este tipo de parásitos. Son utilizados en el tratamiento de filariasis (*Dirofilaria immitis*) con una elevada eficacia sobre los estadios larvales, pero con escaso efecto sobre los parásitos adultos. Si bien los fármacos de este grupo químico tienen un espectro de acción general similar, existen sutiles diferencias entre ellos y cada uno tiene sus propias especies dosis limitantes (Lifschitz, 2000a).

La actividad antihelmíntica depende de la acción del fármaco sobre el parásito y de la presencia de concentraciones efectivas, en términos de nivel y duración, en el sitio de localización parasitaria. De esta manera los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco influyen directamente en el sitio de acción, y en consecuencia en el efecto farmacológico. La utilidad de la farmacocinética para asegurar la eficacia de un antihelmíntico, se basa en la

correlación existente entre el perfil de concentraciones plasmáticas del antihelmíntico, con la concentración de la molécula activa en el lugar de acción (Lanusse y Prichard, 1993).

La farmacocinética de las LMs en ovinos ha sido ampliamente estudiada (Bogan & McKellar, 1994; Imperiale *et al.* 2004, Bassissi *et al.* 2004). IVM es la más difundida por su utilización en diferentes especies animales, existiendo un número importante de estudios farmacocinéticos con este fármaco. Las LMs pueden ser administradas por vía oral, intraruminal, subcutánea, intramuscular y tópica dependiendo del fármaco y de la especie a tratar. La vía de administración y la formulación afectan en forma importante la farmacocinética del fármaco. De esta manera, la mayor biodisponibilidad se obtiene luego de la administración subcutánea, seguido de la administración oral, obteniéndose la menor disponibilidad plasmática luego de la aplicación tópica, aun a dosis altas. En los sistemas productivos predominantes de nuestra región, por su practicidad, la administración parenteral es preferida sobre la oral. Además la administración por vía subcutánea tiene ventajas en la eficacia sobre ectoparásitos comparada con la administración por vía oral. La biodisponibilidad sistémica tras administración oral está sujeta a diferencias entre especies y cabe señalar que los herbívoros presentan en general menor biodisponibilidad tras la administración oral que los carnívoros. La absorción percutánea de IVM se explica en función de su liposolubilidad. La piel puede considerarse una membrana lipídica multiestrato, en la cual el estrato córneo es la barrera para la absorción de fármacos, siendo la liposolubilidad la principal característica físico-química que regula la absorción por esta vía (Baggot y Mc Kellar, 1994). En este sentido se ha sugerido que las diferencias farmacocinéticas entre IVM y MXD pueden deberse a la distinta liposolubilidad de ambos fármacos, de forma que MXD tendría mayor afinidad por el tejido graso, el cual podría actuar como reservorio y contribuir a su larga persistencia en el organismo. Esta teoría también explicaría el mayor volumen de distribución y el menor área bajo la curva observados luego de la administración de MXD (Lanusse *et al.* 1997; Alvinerie *et al.*, 1998).

Debido a su naturaleza lipofílica, las LMs presentan una muy buena distribución con amplios volúmenes de distribución en todas las especies. Además se acumulan en el tejido adiposo que actúa como reservorio y se encontraron altos niveles de estos fármacos en hígado y en grasa. Esta alta lipofilidad determina la importante llegada de estos fármacos a los sitios donde se encuentran los parásitos (Lifschitz *et al.* 2000a). Estudios realizados mostraron que IVM se une en gran medida a la albúmina y lipoproteínas plasmáticas (Rohrer y Evans, 1990). Esta unión podría considerarse como

un factor importante en animales enfermos, con disminución de las proteínas plasmáticas como la PGI clínica, en la que quedaría una gran fracción de droga libre en sangre. IVM persiste en el animal por un período prolongado, debido no solo al bajo clearance plasmático sino también por su acumulación en el tejido adiposo. IVM prácticamente no se metaboliza, gran parte de la dosis se excreta sin cambios. La mayoría de los metabolitos aislados *in vivo* son 24-OH-H2B1a y 24-OH-H2B1b en bovinos, ovinos y ratas (Chiu *et al.* 1986) mientras que en cabras predomina 3-O-dimetil-H2B1b (Alvinerie *et al.* 1994). En ovinos y bovinos algunos metabolitos menos polares fueron encontrados en tejido adiposo, sugiriendo que en ambas especies los metabolitos hepáticos están esterificados con ácidos grasos y almacenados en la grasa como metabolitos no polares (Chiu *et al.* 1989). Diferentes metabolitos monohidroxilados y dihidroxilados fueron recuperados en distintos tejidos en bovinos tratados con MXD (Zulalian *et al.* 1994). Las LMs son eliminadas principalmente por heces en todas las especies independientemente de la vía de administración, y la excreción llega a más del 90 % de la dosis administrada. Debido a su elevada lipofiliidad estos compuestos también son eliminados por leche (Chiu *et al.* 1990; Zulalian *et al.* 1994).

Existen importantes variaciones en la farmacocinética de las LMs entre las diferentes especies animales, pero también son relevantes las variaciones entre individuos de una misma especie que podrían ser atribuibles a la condición corporal, edad, sexo y estado fisiológico (McKellar y Marriner, 1987; Bogan y McKellar, 1988; Scott *et al.* 1990; McKellar *et al.* 1991; Scott y McKellar, 1992; Lanusse *et al.* 1997; Gayrard *et al.* 1999; Barber *et al.* 2003). Los efectos del mal estado nutricional de los animales sobre la farmacocinética de IVM fueron estudiados en bovinos, demostrándose que debido a la alta lipofiliidad de la IVM la movilización de ácidos grasos libres a partir del tejido adiposo podría modificar los patrones de intercambio grasa/plasma. Además la restricción alimentaria reduce la secreción de bilis y por lo tanto la excreción de IVM y otras LMs (Lifschitz *et al.* 1997).

1.2. Resistencia Antihelmíntica

Los tratamientos antihelmínticos generan una importante presión de selección sobre las poblaciones de parásitos, la utilización de estos en forma regular condujo al desarrollo de parásitos resistentes. La RA puede ser definida entonces como la disminución o ausencia de eficacia de un fármaco frente a poblaciones parasitarias que son generalmente susceptibles a esta droga. Se expresa como una adaptación de una población de nematodos frente a una situación permanente de “estrés” como

podría ser la aplicación frecuente de un determinado antihelmíntico, es un carácter heredable y no reversible (Prichard, 1994; Wolstenholme *et al.* 2004).

El desarrollo de RA ocurrió relativamente rápido para todas las familias de drogas y es la consecuencia inevitable de la utilización de antihelmínticos en forma rutinaria (Jackson y Croop, 2000). Las estrategias de control supresivas efectuadas a toda la majada, utilizando antihelmínticos a intervalos regulares correspondientes al período prepatente para irrumpir el ciclo parasitario y prevenir la enfermedad clínica, determinan la velocidad en el desarrollo de la RA (Barton, 1983; Prichard, 2001; Stubbings, 2003). En este sentido, el manejo de la población en “refugio”, es decir la población parasitaria que no está expuesta a las drogas durante el tratamiento, es en la actualidad uno de los factores más importantes para disminuir la diseminación de la RA, proporcionando una fuente de parásitos susceptibles para diluir entre poblaciones resistentes (Abbot *et al.* 2004; Soulsby, 2007).

La RA tiene una base genética. El significado de que la resistencia sea heredable afecta en la velocidad del desarrollo de la resistencia, por ejemplo, antihelmínticos con múltiples sitios de acción, genéticamente independientes causan el desarrollo de resistencia mucho más lento que antihelmínticos con un sitio de acción único y definido (Martin *et al.* 1989). La genética de la RA es compleja, con escaso consenso en la literatura, cada especie de parásito parece exhibir diferentes patrones de resistencia. Además los diferentes modos de acción de los antihelmínticos hacen que cada grupo químico tenga un distinto mecanismo de resistencia, así la resistencia a BZs en *H. contortus* fue descrita como un carácter recesivo y multigénico mientras que en *T. colubriformis* es un carácter incompleto recesivo (Le Jambre *et al.* 1999; Sutherland y Scott, 2010).

La RA puede desarrollarse por diferentes mecanismos. En primer lugar, los parásitos resistentes pueden tener modificado el sitio de acción del antihelmíntico, de esta manera no es posible la unión o bien la unión es menos efectiva. En segundo lugar, puede haber un cambio en el metabolismo del fármaco generando que esta no se convierta en su metabolito activo o que no se una a los sitios de acción. En tercer lugar, un cambio en la distribución del fármaco en el parásito puede evitar que éste alcance su sitio de acción. En cuarto lugar, un cambio en la expresión génica del sitio de acción del fármaco puede imposibilitar su acción. Por último, y en forma concomitante con los mecanismos descritos, existen otros mecanismos no-específicos de RA, es decir mecanismos que no están directamente relacionados al sitio de acción del fármaco. Estos podrían ser cambios en los niveles de

expresión de proteínas no-blanco utilizadas para metabolizar las drogas y las toxinas por parte del parásito (Prichard, 2001; Wolstenholme *et al.* 2004).

En la resistencia a las LMs, existe poca evidencia que los cambios en los canales GluCl sean realmente significativos en la resistencia poblacional de parásitos (El-Abdellati *et al.* 2011; Williamson *et al.* 2011). La mayoría de los mecanismos identificados hasta la fecha han usado una aproximación del gen candidato para identificar cambios cualitativos que confieren resistencia. El éxito limitado de esta aproximación es parcial porque los estudios genéticos clásicos para identificar “genes resistentes” son difíciles, especialmente cuando el modo de acción de los antihelmínticos no está del todo dilucidado. Los mecanismos alternativos de resistencia como los cambios en los niveles de expresión de las glicoproteínas están actualmente bajo estudio y parecen tener mayor importancia (Xu *et al.* 1998; Kerboeuf *et al.* 2002; Lespine, 2012). Las diferencias en los niveles de expresión de proteínas pueden ser constitutivos, donde la expresión de un gen siempre se expresa en forma diferencial entre parásitos susceptibles y resistentes, o inducibles en donde un cambio en la expresión del gen se observa luego de la administración del antihelmíntico. Los cambios en los patrones de expresión de los genes pueden resultar tanto en una regulación positiva o negativa, es decir con el aumento o la disminución del número de copias del gen. Las dos familias de genes asociadas a la resistencia fenotípica a las LMs son las glicoproteínas y citocromo P450s (von Samson-Himmelstjerna, 2005).

Recientemente ha tomado mayor relevancia el conocimiento sobre la glicoproteína P (Gp-P). Si bien la Gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples drogas anticancerígenas, posteriormente fue caracterizada como una proteína de membrana encargada de secretar drogas y diversos compuestos a través de un mecanismo ATP dependiente (Ling y Thompson, 1974; Ballent *et al.* 2005).

La Gp-P es un complejo glicoproteico de membrana de 1280 aminoácidos con un peso molecular de 170 kDa. Está compuesta por dos subunidades simétricas y homólogas que actúan en forma coordinada como una unidad. Cada mitad consta de seis dominios transmembrana y de un dominio de unión al ATP localizado en la superficie citosólica. Si bien son necesarios los dos sitios de unión al ATP para que la actividad de la Gp-P se produzca eficientemente, la interacción entre los sitios de unión al ATP y los dominios de unión a las drogas son esenciales para que se produzca la hidrólisis del ATP estimulada por el sustrato y el transporte del mismo. Mediante este mecanismo de

transporte activo los sustratos son secretados sin modificar fuera de la célula contra el gradiente de concentración, lo que provoca una disminución de su concentración intracelular (Fardel *et al.* 1996; Ballent *et al.* 2005).

Los estudios realizados sobre Gp-P en nematodos están concentrados sobre *Caenorhabditis elegans*, *Onchocerca volvulus* y *H. contortus* (Sangster, 1994; Jones y George, 2005). Estos parásitos tienen más Gp-Ps que los mamíferos, posiblemente debido a que los parásitos viven en un ambiente más hostil (Lespine *et al.* 2008). Por ejemplo los estadios larvales de vida libre y los huevos están expuestos a una serie de condiciones climáticas adversas y de toxinas provenientes de hongos de la pastura o de la materia fecal, y los adultos están expuestos a un ambiente ácido y a enzimas digestivas en el abomaso del hospedador (Sutherland y Scott, 2010). Las Gp-Ps en los nematodos están presentes en variados tejidos incluyendo las células faríngeas y del tracto intestinal de *H. contortus* y *C. elegans*, vainas de L3, cubierta de los huevos y cutículas de *H. contortus* y microfilarias y adultos de *O. volvulus* (Lincke *et al.* 1993; Kwa *et al.* 1998; Huang y Prichard, 1999; Prichard y Roulet, 2007; Lespine, 2008). Las Gp-Ps parecen jugar un rol principal en la absorción, distribución y eliminación de las LMs tanto en el huésped como en los parásitos (Lespine *et al.* 2008; Ballent *et al.* 2012).

Como se mencionó anteriormente, las Gp-Ps son muy abundantes en los nematodos. Diversas pruebas moleculares han identificado al menos 14 genes asociados a la Gp-P en *C. elegans* y al menos 12 en *H. contortus* (Sangster, 1999; Kerboeuf *et al.* 2003; Blackhall *et al.* 2008). Se observó un incremento en los niveles de ARN mensajero de Gp-P en *H. contortus* seleccionado con IVM (Xu *et al.* 1998) y cambios en las frecuencias de alelos y/o reducciones en la diversidad genética se reportaron entre aislamientos de *H. contortus* y *O. volvulus* seleccionados con IVM o MXD (Blackhall *et al.* 1998; Ardelli *et al.* 2005; 2006 a y b). Estas observaciones sugieren que los antihelmínticos, como las LMs actúan generando una fuerte presión de selección sobre las Gp-Ps. La expresión de OvGp-P1 en *O. volvulus* está negativamente correlacionada con la susceptibilidad a IVM según el estadio, así las microfilarias expresan menos Gp-P y son más susceptibles a IVM que los adultos (Huang y Prichard, 1999). La resistencia a IVM en *C. elegans* está asociada con un incremento en la expresión de Gp-Ps y a otras proteínas de membrana pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC (James y Davey, 2008). Las Gp-Ps aparecen siempre implicadas en la resistencia a las LMs, y diferentes trabajos *in vivo* corroboraron que la co-

administración de un modulador de Gp-Ps junto con MXD o IVM incrementa la eficacia de estos antihelmínticos frente a cepas de parásitos resistentes (Xu *et al.* 1998, Lifschitz *et al.* 2010b).

1.2.1. Detección de la RA

La evaluación de la eficacia y potencial resistencia de los nematodos gastrointestinales se basa principalmente en técnicas *in vivo* como el Test de Reducción del Conteo de Huevos (TRCH) y el Test de Eficacia Controlada (TEC) (Coles *et al.* 1992; Wood *et al.* 1995). Estas técnicas presentan buena sensibilidad cuando el porcentaje de RA de la población de parásitos es mayor al 25 %, por lo tanto no son efectivas para detectar problemas de resistencia desde sus inicios (Martin *et al.* 1989; Coles *et al.* 1992).

En las últimas décadas se vienen desarrollando y perfeccionando diferentes técnicas de diagnóstico de resistencia *in vitro*, como el Test de eclosión de huevos (TEH), Test de desarrollo larval (TDL), Test de inhibición de la alimentación larval (TIAL) y Test de inhibición de la motilidad larval (TIML) (Coles *et al.* 2005; Demeler *et al.* 2010a y b). Dichas técnicas presentan mayor sensibilidad que las técnicas *in vivo*, no obstante las técnicas basadas en la biología molecular en donde especímenes de parásitos en forma individual o muestras de pool pueden ser evaluadas superan ampliamente la sensibilidad de las pruebas *in vitro*, aun cuando la frecuencia poblacional de la RA es baja (Kotze *et al.*, 2006).

1.2.2. Pruebas *in vivo*

El TRCH compara la cantidad de huevos por gramo (HPG) de materia fecal, de animales individuales, antes y después del tratamiento, es relativamente fácil de realizar y puede aplicarse a todos los principios activos (Taylor *et al.* 2002). El tiempo transcurrido entre el tratamiento y el muestreo de evaluación en la reducción del HPG debe estar dentro de los 10 a los 17 días. Se recomienda la inclusión de un grupo control sin tratamiento para identificar las fluctuaciones naturales de la eliminación de huevos por materia fecal en este período. La World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) estableció que la RA queda confirmada cuando el porcentaje de reducción en ovinos es menor al 95 % y cuando el intervalo de confianza es menor al 90 %, si una sola de las condiciones está presente, se sospecha de RA (Coles *et al.* 1992).

Sin embargo, fueron reportadas algunas limitaciones para el TRCH. En primer lugar, la cantidad de huevos eliminados por el animal no siempre se correlaciona con la carga parasitaria real (Taylor *et al.* 2002). En segundo lugar, algunas drogas como IVM, pueden temporariamente suprimir la oviposición, consiguiéndose falsos valores positivos de la efectividad de la droga (Le Jambre *et al.* 1995). En tercer lugar, como se mencionó anteriormente, la escasa sensibilidad cuando el porcentaje de la población parasitaria resistente no supera el 25 %, (Martin *et al.* 1989; Coles *et al.* 1992). En cuarto lugar, al valorar la resistencia al LVM se pueden obtener falsos resultados positivos cuando se extraen las muestras de materia fecal a los 11 o más días posteriores al tratamiento, debido al desarrollo de formas inmaduras de los nematodos que escapan a la acción del fármaco (Grimshaw *et al.* 1996). Por último es necesario complementar los resultados del test con cultivos de los huevos obtenidos para determinar las especies de nematodos presentes, aunque las condiciones de los cultivos pueden favorecer el desarrollo de algunas especies sobre otras (Presidente, 1985).

El TEC es la prueba de oro para calcular la eficacia de los antihelmínticos (Mc Kellar y Jackson, 2004; Coles *et al.* 2006). Esta técnica consiste en la obtención de un porcentaje de eficacia calculado mediante la comparación de poblaciones parasitarias a la necropsia, a los 15 días, de animales tratados y animales no tratados con fármacos antihelmínticos, recuperando, identificando y contando los parásitos presentes. Se confirma la RA cuando la reducción en la cuenta de parásitos adultos es menor al 95 % en ovinos (Coles *et al.* 1992; Wood *et al.* 1995). Este test representa el método más confiable en la evolución de la actividad antihelmíntica ya que permite establecer con mayor precisión los alcances del problema y las especies parasitarias involucradas. Sin embargo su realización implica altos costos, mucha labor y también es cuestionada por razones éticas sobre el uso de animales de experimentación (Anziani y Fiel, 2005).

1.2.3. Pruebas *in vitro*

Estas técnicas presentan como ventaja los bajos costos de ejecución, ya que requieren pocos insumos, principalmente cuando se desea probar gran cantidad de principios activos y por la disminución en el número de muestreos para realizar el diagnóstico; además son de rápida y fácil implementación (Sangster y Gill, 1999). En general, involucran la incubación de uno de los estadios de vida libre de los parásitos en un rango de concentraciones de los fármacos y se evalúan diferentes parámetros de vitalidad generando curvas dosis-respuesta (Demeler *et al.* 2010a). Sin embargo una

posible desventaja es que no reflejan la farmacología de la droga en el sistema hospedador-parásito, por lo que es necesario que sean validadas con información *in vivo* (Sangster y Gill, 1999).

El TEH solamente puede ser utilizado para los BZs. Las LMs al igual que el LEV no tienen efecto ovicida (Coles, 2005). Básicamente consiste en el enfrentamiento de huevos de nematodos colectados de las heces frescas e incubados en diluciones seriadas de droga. Se calcula el porcentaje de huevos eclosionados, permitiendo el cálculo de una dosis discriminante a partir de una curva dosis-respuesta. En infecciones mixtas de nematodos gastrointestinales es posible identificar la especie de las larvas eclosionadas. Un protocolo de estandarización ha sido determinado para permitir la comparación repetible entre laboratorios (von Samson-Himmelstjerna *et al.* 2009).

El TDL puede ser utilizado con cualquier grupo de antihelmínticos (Coles, 2005; Luque 2013; Dolinská, 2013) y consiste en el desarrollo de L1 a L3 en presencia de varias concentraciones de la droga a evaluar, en un medio enriquecido con *Escherichia coli* como fuente de alimento. Al cabo de 7 días se calcula el porcentaje de inhibición del desarrollo por acción de la droga y se expresa en curvas dosis-respuesta (Coles, 2005).

El TIAL es utilizado para evaluar la resistencia a LEV y LMs. Consiste en el enfrentamiento de L1 a diferentes concentraciones de droga y luego introducidos en un medio de cultivo con *E. coli* marcada con isotiocianato de fluoresceína (FICT). Luego de la incubación se calcula el porcentaje de inhibición de la alimentación contando la cantidad de larvas fluorescentes y expresándolo en curvas dosis-respuesta (Álvarez Sánchez *et al.* 2005).

El TIML también se utiliza para la detección de resistencia a LEV y LMs. Esta prueba consiste en enfrentar L3 a diferentes concentraciones de droga y luego evaluar su motilidad mediante el pasaje por una malla que permite solamente el pasaje de larvas vivas y activas. Contando las larvas migradas y las no migradas se puede calcular el porcentaje de inhibición de la motilidad y expresarlo en curvas dosis-respuesta (Demeler, 2010a).

1.2.4. Pruebas de Biología Molecular

La RA tiene una base genética, ya sea por cambios cualitativos (mutaciones) o cuantitativos (alteración en la expresión de genes). Actualmente se está trabajando en la identificación de esos cambios, lo que permitirá el desarrollo de pruebas basadas en el ADN. El desarrollo de pruebas

moleculares de elevada sensibilidad permitió detectar la resistencia a BZs en niveles muy bajos comparado con los métodos *in vivo* e *in vitro* (von Samson-Himmelsjerna, 2006). Estas pruebas permiten identificar los genes asociados a la RA en especímenes aislados dentro de una población o bien en poblaciones mixtas, mostrando la prevalencia de la resistencia en cada especie (Silvestre y Humbert, 2000). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) solo está disponible para el diagnóstico de resistencia a BZs en nematodos de rumiantes (Silvestre y Humbert, 2000; von Samson-Himmelsjerna y Blackhall, 2005). También está descrito un protocolo de PCR en tiempo real para este grupo químico que presentó altas correlaciones con otras técnicas de diagnóstico *in vivo* e *in vitro* (TRCH y TEH) (Álvarez Sánchez *et al.* 2005). A pesar de la elevada sensibilidad de estas técnicas, son demasiado costosas para ser utilizadas en el diagnóstico rutinario de resistencia (von Samson-Himmelsjerna y Blackhall, 2005). Los recientes estudios utilizan la tecnología de Pirosecuenciación. Esta, permite la precisa estimación de la frecuencia de alelos en un pool de ADN y a su vez el procesamiento de varias muestras al mismo tiempo (Lavebratt *et al.* 2004; von Samson-Himmelsjerna y Blackhall, 2005), sin embargo, el equipamiento es muy costoso y aún no se encuentra muy difundido.

A diferencia de los BZs, y a pesar de los trabajos realizados en todo el mundo, para las LMs no se han descrito técnicas moleculares específicas para el diagnóstico de resistencia de rutina. El conocimiento limitado en las bases moleculares de la resistencia a otros grupos de antihelmínticos y la resistencia poligénica a LEV (Sangster *et al.* 1991) e IVM (McCavera *et al.* 2007) hace mucho más complejo el desarrollo de marcadores moleculares.

Cuando se usan las pruebas moleculares, al igual que las pruebas *in vivo* e *in vitro*, el desafío consiste en la correcta identificación de la resistencia en infestaciones parasitarias mixtas. No obstante, el hecho de diagnosticar la resistencia basándose solamente en una mutación no tiene en cuenta otros mecanismos de resistencia no específicos que pueden permitir la expresión fenotípica de resistencia en las poblaciones parasitarias. Esto significa que los parásitos no revelen mutaciones específicas asociadas a resistencia en las pruebas moleculares específicas, sin embargo si exhiban cambios en la expresión génica o mutaciones que le permitan ser fenotípicamente resistentes (Coles, 2005).

La profundización en el conocimiento de estos mecanismos en los géneros parasitarios resistentes y la potencial selección de otros mecanismos de resistencia, es importante para comprender el fenómeno en su conjunto y diseñar estrategias que preserven el uso clínico de estos fármacos.

1.3. Hipótesis general

Existe una relación entre los patrones de concentración de las Lactonas Macroclínicas en plasma, tejidos/fluidos de localización parasitaria del ovino y en el parásito “blanco” y la eficacia antihelmíntica sobre *Haemonchus contortus* resistente.

El desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral plantea responder a las siguientes hipótesis:

- 1.3.1. *La relación entre concentraciones en el sitio de localización parasitaria, concentraciones en el parásito “blanco” y eficacia antihelmíntica para diferentes LMs en ovinos se ve afectado por factores que pueden ser caracterizados in vivo.*
- 1.3.2. *La actividad de las LMs contra H. contortus resistente puede ser caracterizada in vitro.*
- 1.3.3. *La resistencia antihelmíntica genera cambios en el parásito H. contortus.*

1.4. Objetivo General

Estudiar la relación que existe entre las concentraciones de diferentes Lactonas Macroclínicas en plasma, tejidos/fluidos de localización parasitaria del ovino, en el parásito “blanco” y la eficacia sobre *Haemonchus contortus* resistente.

Para cumplir con el **objetivo general** y responder a las hipótesis planteadas se propone implementar un Plan de Trabajo dividido en tres (3) Secciones Experimentales:

Sección Experimental I: Caracterización *in vivo* de factores que afectan la relación entre concentraciones en el sitio de localización parasitaria, concentraciones en el parásito “blanco” y eficacia antihelmíntica para diferentes LMs.

Sección Experimental II: Caracterización *in vitro* de la actividad de las LMs contra *Haemonchus contortus* resistente.

Sección Experimental III: Cambios génicos en *Haemonchus contortus* asociados a la resistencia antihelmíntica.

Capítulo II

DESARROLLO METODOLOGICO

A continuación se describen los aspectos analítico-metodológicos utilizados en el desarrollo general de la presente Tesis Doctoral. Los detalles específicos de cada sección experimental, se describen en el apartado “Diseño experimental” correspondiente

2.1. Metodología Experimental

La estrategia de investigación que se siguió en la presente Tesis Doctoral, implicó el trabajo coordinado entre el Laboratorio de Farmacología, de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), y el Laboratorio de Parasitología, Grupo de Sanidad Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) EEA Balcarce, Argentina.

2.2. Cuantificación de fármacos

El desarrollo y la validación de las metodologías para la extracción físico-química e identificación y cuantificación cromatográfica de las moléculas bajo estudio en las diferentes matrices biológicas representaron la base técnico-analítica requerida para llevar a cabo todos los estudios farmacocinéticos que se describen en los capítulos siguientes.

2.2.1. Químicos

Para la validación de la metodología analítica se utilizaron estándares puros (91,9-99% de pureza) de referencia de IVM, ABM, MXD, DRM (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, USA). Los solventes (acetonitrilo y metanol) usados durante la extracción y el análisis de los analitos fueron de grado HPLC y provistos por Sintorgan® (Buenos Aires, Argentina). El agua utilizada fue destilada y posteriormente deionizada utilizando un sistema de purificación de agua (Simplicity®, Millipore, Brasil).

2.2.2. Preparación de estándares

Los estándares de IVM, ABM, MXD y DRM fueron solubilizados en metanol (grado HPLC, JT Baker®, USA) para obtener una solución madre de 1 mg/ml metanol. A partir de la misma se

realizaron sucesivas diluciones 1:10 en metanol para obtener las diferentes concentraciones utilizadas, ya sea para su inyección directa en el sistema cromatográfico o para adicionar a las muestras blanco de plasma y de los diferentes tejidos/contenidos gastrointestinales y muestras de parásitos. Una vez preparadas las diferentes diluciones fueron conservadas a -18°C, protegidas de la luz.

2.2.3. Preparación de muestras, procedimientos de extracción y análisis por HPLC

La cuantificación de las LMs en los diferentes tejidos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC), para lo cual fue necesario realizar la extracción química de las moléculas, derivatización y posterior medición.

El proceso de extracción química a partir de las muestras se realizó mediante la técnica descrita por Alvinerie *et al.* (1993) modificada por Lifschitz *et al.* (1999, 2000a y 2004). Las muestras de tejidos y fluidos fueron homogeneizadas y se realizó una extracción en fase sólida luego de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. De cada muestra se tomó una alícuota de 1ml de plasma o 0,5 g de tejidos del tracto gastrointestinal (mucosas y contenido de abomaso e intestino) o 50 mg de parásitos; se adicionó con 10 ng de estándar interno (ABM o DRM) y se agregó 1ml de acetonitrilo. Las muestras fueron agitadas por 20 minutos en agitador (Multi-tube vortexer, VWR Scientific Products, West Chester, PA, USA) y luego sometidas al proceso de sonicación (Baño de ultrasonido) (Transsonic 570/H, Lab-Line Instruments Inc., USA) por 10 minutos y finalmente se centrifugaron a 2000g por 15 minutos (Jouan®, BR 4i Centrifuge, Saint Herblain, France). El sobrenadante fue transferido a otro tubo en forma manual y se repitió el procedimiento, juntando finalmente los sobrenadantes de cada muestra. Una vez finalizada la extracción líquido-líquida la muestra fue colocada apropiadamente en el rack del procesador de muestras Aspec XL (Gilson, Villiers Le Bel, France) para realizar la extracción en fase sólida en forma automatizada. El eluyente fue evaporado a sequedad mediante una corriente suave de nitrógeno seco a 50 °C en baño María.

La derivatización se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por De Montigny *et al.* (1990). El residuo seco obtenido fue disuelto en 100 µl de una solución 1:1 v/v de N- metilimidazol (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) en acetonitrilo y se agregó 150 µl de una solución 1:2 v/v de trifluoroacético anhídrido (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) en acetonitrilo. Posteriormente una alícuota de 100 µl de la solución obtenida fue inyectada directamente en el cromatógrafo.

La concentración de cada compuesto fue determinada por HPLC según la técnica descrita por Lifschitz *et al.* (2000a) utilizando un sistema HPLC Shimadzu 10 A con inyector automático y detector de fluorescencia (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Las condiciones cromatográficas incluyeron una fase móvil de ácido acético al 0,2 % en agua- metanol-acetonitrilo (2:60:38 v/v/v) con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min a través de una columna de C18 en fase reversa (Thermoquest, 5 µm, 250 mm x 4.60 mm). La detección de fluorescencia se realizó con una longitud de onda de excitación de 365 nm y 475 nm de longitud de onda de emisión.

Las rectas de calibración para las diferentes LMs (IVM-ABM-MXD) se prepararon añadiendo concentraciones crecientes del fármaco, en el rango de 0,1-50 ng/ml (plasma), 4-200 ng/g (contenidos, mucosas gastrointestinales y parásitos) a muestras de la matriz correspondiente libre de fármaco. Se utilizó un análisis de regresión lineal para cada una de las rectas de calibración para determinar las concentraciones del fármaco en las muestras provenientes de los animales tratados utilizando la ecuación de la recta: $y = ax + b$, donde

a: pendiente de la recta de calibración

b: intercepto

x: concentración observada

y: repuesta del detector expresada en área cromatográfica

La validación completa de los procedimientos analíticos utilizados para la extracción y cuantificación de las LMs a partir de plasma, tejidos (mucosa y contenido abomasal e intestinal) y parásitos tiene como objetivo demostrar que estos son adecuados para el propósito establecido y se realizó según los procedimientos descritos por Lifschitz *et al.* (2000a) considerando los siguientes parámetros: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, porcentaje de recuperación, precisión y exactitud del método.

Los límites de detección y de cuantificación fueron obtenidos de acuerdo a la concentración calculada en las muestras blancos de plasma ovino, según los valores de área cromatográfica de las muestras establecidas en el tiempo de retención de cada LM.

a. Límite de detección: es la mínima cantidad de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada por el método con precisión y exactitud aceptables. El promedio del

ruido de la línea base de la curva del cromatograma más 3 desviaciones estándar se definieron como el límite de detección.

b. Límite de cuantificación: es la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada por el método con precisión y exactitud aceptables. El promedio del ruido de la línea base del cromatograma más 6 desviaciones estándar se establecieron como el límite de cuantificación.

c. Linealidad: indica la capacidad del método para dar valores que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro del rango fijado y se determinaron mediante la inyección de muestras de plasma sobrecargadas con cada LM a concentraciones crecientes. Las rectas de calibración se establecieron utilizando un análisis de regresión lineal, representando las concentraciones de las drogas en el eje de la abscisa, y el área de los picos cromatográficos en el eje de la ordenada.

d. Recuperación: fue calculada comparando las áreas de los picos cromatográficos en muestras de plasma sobrecargadas con concentraciones conocidas de cada LM, con las obtenidas de la inyección directa del estándar de cada LM disuelto en metanol, usando ABM o DRM como estándar interno. Los resultados se expresaron en porcentajes (%) y se obtuvieron de las muestras adicionadas con cada LM con diferentes concentraciones conocidas.

e. Precisión: es definida como la estimación de la variabilidad de las mediciones obtenidas de un muestreo múltiple y se expresó como el coeficiente de variación (CV) de los resultados de la recta de calibración.

2.2.4. Análisis Farmacocinético

El análisis farmacocinético computarizado se realizó mediante el programa PK Solutions 2.0 (Ashland, Ohio, USA). Para la evaluación no-compartmental se calcularon los principales parámetros farmacocinéticos de mayor relevancia clínica de acuerdo a lo descrito por Gibaldi y Perrier (1982). Se determinó la constante de absorción (K_{ab}) utilizando el método de residuales (Garibaldi y Perrier, 1982). La constante de eliminación (β) se calculó tomando al menos 4 -5 puntos de las fases de eliminación. K_{ab} y β fueron usados para calcular la vida media de absorción ($t_{1/2 ab}$) y la vida media de eliminación ($t_{1/2 el}$), de la siguiente manera: logaritmo natural de $2/K_{ab}$ y logaritmo natural de $2/\beta$. Las concentraciones máximas (C_{max}) y el tiempo en alcanzar estas

concentraciones máximas (T max), fueron leídos en las curvas concentración versus tiempo para cada droga y en cada animal individual. El área bajo la curva (ABC) fue calculada por el método de los trapezoides (Baggot, 1995) y el tiempo medio de residencia (TMR) se calculó por análisis no-compartamental aplicando la teoría del momento estadístico: $TMR = ABMC / ABC$, donde ABC fue previamente definido y ABMC es el área bajo el momento de la curva extrapolada al infinito (Garibaldi y Perrier, 1982).

2.2.5. Análisis estadístico

Las concentraciones de las diferentes moléculas utilizadas y sus parámetros farmacocinéticos son presentados como promedio \pm desvío estándar. Los promedios de los parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron comparados estadísticamente utilizando el programa Instat 3.0 (Graph Pad software Inc., San Diego, USA). Se utilizó el Test de Student o ANOVA para la comparación de datos que presentaron una distribución normal y los test no paramétricos Mann-Whitney y Kruskal Wallis en los casos en que los desvíos estándar fueron significativamente diferentes entre los grupos comparados. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

2.3. Análisis parasitológicos

2.3.1 Test de Reducción del conteo de huevos en materia fecal (TRCH)

El conteo de HPG se realizó siguiendo la técnica de McMaster modificada (Robert y O`Sullivan, 1949). Para ello se colocó 1 g de materia fecal de cada muestra en un mortero, se mezcló con 59 cm³ de solución sobresaturada de cloruro de sodio (densidad 1200) y luego se filtró a través de un colador común. El contenido se trasvasó a un vaso de precipitado, y luego de la agitación lenta para evitar la formación de burbujas, se tomaron con una pipeta Pasteur alícuotas del contenido para cargar la cámara de Mc Master modificada. Luego de unos segundos de reposo se procedió a la lectura de la cámara al microscopio óptico como indica la técnica.

Para minimizar los errores de dilución por una mayor cantidad de agua en la materia fecal, se utilizaron factores de corrección (Skerman y Hillard, 1966)

Factor 1: boñigas bien diferenciadas

Factor 1,5: boñigas pegadas

Factor 2: materia fecal semi- blanda (sin boñigas)

Factor 3: materia fecal líquida (diarrea)

La identificación de géneros parasitarios se realizó con un coprocultivo de 10 g de materia fecal de un “pool” por grupo, mediante la técnica de Henriksen y Korsholm (1983), para la obtención e identificación de larvas infestivas. La identificación de larvas se realizó por observación directa al microscopio óptico de 100 larvas obtenidas de cada cultivo (Niec, 1968), utilizando unas gotas de solución yodada para facilitar la lectura (Fiel *et al.* 1998).

La eficacia de cada tratamiento se determinó calculando el porcentaje de reducción de la media aritmética del conteo de huevos (Coles *et al.* 1992) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TRCH (\%)} = 100 * (1 - T/C)$$

Donde T es la media aritmética del grupo tratado y C es la media aritmética del grupo control.

2.3.2. Test de eficacia controlada (TEC)

El cómputo de nematodos adultos presentes en el tracto gastrointestinal se realizó mediante la técnica de lavado de órganos (Wood *et al.* 1995). Dicha técnica consiste en la extracción individual de cada órgano (abomaso, intestino delgado e intestino grueso) previa ligadura en ambos extremos, sección longitudinal de los mismos y el contenido del interior, al igual que el agua utilizada para el lavado de las mucosas fue colectado en baldes plásticos identificados. El contenido de cada balde fue lavado y clarificado en frascos con una malla de 38 µm en la tapa y las muestras obtenidas se transfirieron por alícuotas a placas de Petri de 15 cm de diámetro. Sobre luz invertida se procedió al conteo e identificación de géneros de nematodos presentes en cada muestra. Para corroborar la clasificación inicial se colocaron los nematodos en portaobjetos y se observaron al microscopio óptico.

El cálculo de la eficacia se realizó utilizando la siguiente fórmula de acuerdo a lo sugerido por la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (Wood *et al.* 1995).

$$\% E = [(C - T) / C] * 100$$

Donde % E es el porcentaje de eficacia del tratamiento con una droga contra un género parasitario específico, T es la media geométrica del número de parásitos adultos en el grupo tratado y C es la

media geométrica del número de parásitos adultos en el grupo control. La media geométrica es utilizada de acuerdo a lo recomendado por Wood *et al.* (1995).

2.3.3. Análisis estadístico

El recuento de huevos por gramos de materia fecal y de los parásitos adultos recolectados de los órganos digestivos se expresan como media y desvío estándar de los datos y fueron comparados por métodos no paramétricos (test de Kruskal-Wallis o Mann Whitney). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados con significancia estadística. Se utilizó el paquete estadístico InStat 3.0 Software (Graph Pad Software, CA, USA).

2.4. Test *in vitro* de inhibición de la motilidad larvaria

La técnica utilizada para evaluar la inhibición de la motilidad larvaria fue una modificación a la originalmente descrita por Demeler *et al.* (2010a). Durante el período de estandarización se evaluaron, en paralelo, diferentes temperaturas y tiempos de incubación, base líquida o matriz de agar, desenvainamiento previo de las larvas 3 en hipoclorito de sodio y longevidad de las L3. Las variantes más apropiadas se utilizaron luego combinadas y fueron evaluadas en un rango de concentraciones de drogas.

Las soluciones de las drogas fueron preparadas por disolución del producto comercial utilizado en el tratamiento *in vivo* en dimetilsulfóxido (DMSO al 100 %) seguido de disolución en agua bidestilada, logrando 10 concentraciones diferentes y una concentración final en cada pocillo de 0,5 % de DMSO. Las concentraciones finales de IVM fueron del rango de 5 ng/g a 550 ng/g. Se seleccionó este intervalo por incluir los valores correspondientes a los hallados en plasma, contenido abomasal y parásitos luego del tratamiento con IVM (0,2 mg/Kg) en los experimentos *in vivo* desarrollados en esta tesis (Sección Experimental 1).

Las L3 utilizadas en la prueba, se obtuvieron a partir de muestras de materia fecal proveniente de animales “dadores de larvas” infestados experimentalmente con un aislamiento de *H. contortus* multi-droga resistente (R8) y un aislamiento de *H. contortus* multi-droga susceptible (CEDIVE) (Guzmán *et al.* 2017).

Para lograr animales dadores de cada aislamiento, se recuperaron ejemplares de hembras adultas de *H. contortus* mediante la necropsia parasitológica de un animal infestado naturalmente con

infestación mixta resistente (Reserva 8) y un animal infestado naturalmente en un establecimiento con susceptibilidad probada a diferentes drogas mediante el test de eficacia controlada (CEDIVE).

A partir del macerado de las hembras adultas de *H. contortus* de cada aislamiento por separado, se obtuvieron los huevos que fueron colocados en cultivo con materia fecal estéril y telgopor granulado durante 15 días en estufa a 24 °C en condiciones aeróbicas y humedad apropiada según lo descrito por Henriksen y Korsholm (1983). La recuperación de las larvas se efectuó mediante la técnica de Baermann, el cultivo de materia fecal se colocó dentro de una bolsa de gasa doble sumergida en un embudo con agua destilada a temperatura ambiente, pasadas 24 horas se recuperaron las L3 tomando alícuotas de la solución del fondo del embudo. La suspensión de larvas obtenida fue diluida hasta obtener alícuotas con una concentración de 1000 L3 de *H. contortus*.

Con las larvas L3 obtenidas se infectaron artificialmente corderos dadores con valor 0 de HPG (de sucesivos muestreos no consecutivos), pasados 21 días post infección se tomaron muestras de materia fecal, con el fin de obtener huevos puros de *H. contortus* resistente y/o susceptible y realizar cultivos puros de cada cepa. Las L3 obtenidas fueron utilizadas inmediatamente o almacenadas en botellas de cultivo celular en heladera por un tiempo no mayor a 2 meses antes de ser utilizadas.

La identificación de género de cada aislamiento fue cotejada por observación al microscopio óptico y morfometría (Jacquet *et al.* 1996; Niec, 1968).

2.4.1. Prueba de inhibición de la migración larval

Para realizar esta prueba se utilizaron placas de cultivo celular de 24 pocillos. En cada pocillo de la primera placa (placa de incubación) se colocaron entre 80 a 100 larvas en suspensión, se les adicionaron 90 µl de la solución de IVM en diferentes concentraciones y agua destilada c.s.p. hasta alcanzar un volumen total de 1,8 ml. Posteriormente se incubaron por 24 horas en oscuridad a 24 °C en estufa biológica.

Transcurrido este tiempo, el contenido completo de cada pocillo fue transferido a través de un filtro especialmente diseñado de 25 µ, suspendido en las filas A y C de una segunda placa (placa de migración). La placa de migración completa se colocó en una estufa biológica por 24 horas a 25 °C con iluminación inferior. Se chequeó mediante la observación directa en microscopio

estereoscópico, que la transferencia de larvas del contenido haya sido completa. Por cada placa de incubación se utilizaron dos placas de migración.

Finalizada la incubación, los filtros se levantaron suavemente de los pocillos de la línea A y C de cada placa, se enjuagaron para devolver las larvas adheridas por fuera al pocillo correspondiente. Posteriormente, las larvas no-migradas que quedaron como remanente en el filtro se volcaron en las líneas contiguas (B y D respectivamente), de la placa de migración y se procedió a contar el número de larvas en todos los pocillos (migradas y no migradas) en microscopio invertido estereoscópico.

Cada aislamiento se sometió a ocho concentraciones de droga, con 6 repeticiones por concentración en cada placa y por duplicado (2 placas de incubación por vez). A su vez se realizaron al menos 3 pruebas completas para cada aislamiento. Se incluyó en cada prueba, un control sin droga (0,5 % DMSO) y un control positivo (solución stock, 5 % DMSO), por duplicados. El porcentaje de DMSO en el control positivo fue de 5 % debido a limitaciones en la solubilidad de la IVM en concentraciones mayores de 10^{-4} M. Esta concentración evita la migración de las larvas y por ello es el control positivo. Para cada concentración de droga y cada control se calculó el porcentaje de inhibición de la migración utilizando la siguiente fórmula:

% de inhibición: (Número de larvas no migradas/Número total de larvas) * 100

2.4.2. Análisis estadístico

Para ajustar los datos a una curva dosis respuesta mediante una regresión no lineal, se utilizó una ecuación logística de cuatro parámetros, con pendiente variable, utilizando el programa GraphPad Prism. Se realizó una transformación logarítmica de todos los datos ($X = \log X$) y restringiendo los valores inferiores a 0 %.

Se calculó la dosis inhibitoria 50 (DI50), dosis inhibitoria 90 (DI90), dosis inhibitoria 95 (DI95), dosis inhibitoria 99 (DI99) y el intervalo de confianza al 95 % (IC 95 %). Para cada aislamiento, la susceptibilidad o resistencia a cada droga se expresó como un factor de resistencia (FR) (promedio de la DI50 de la cepa resistente/ promedio de la DI50 para la cepa susceptible). Adicionalmente se calculó la diferencia estadística entre los valores de las DI50 de las cepas (valor p).

2.5. Test *in vitro* con especímenes adultos de parásitos

2.5.1. Medición de la acumulación de IVM – MXD en *H. contortus*

Se seleccionaron corderos infestados naturalmente con parásitos resistentes de la Reserva 8. Luego de su eutanasia, se recolectaron especímenes de *H. contortus* directamente del abomaso. Los parásitos fueron colocados inmediatamente en placas de Petri con abundante solución salina a 37 °C con la finalidad de lavarlos y eliminar los materiales adheridos a ellos. Posteriormente se colocaron 20 mg de parásitos en un tubo de Khan con 1 ml de medio RPMI (Sigma Chemical, St Luis, MO, USA) y fueron incubados a 37 °C en baño maría durante 30 minutos para el acostumbramiento de los mismos a las condiciones experimentales.

Se realizó la dilución de IVM y MXD en etanol y se agregaron las soluciones de droga a cada tubo hasta una concentración final de 0,5 µM y 5 µM. La concentración final de etanol en cada tubo de Khan fue solamente del 0,1 % (v/v) para prevenir algún posible efecto nocivo sobre los parásitos. Se realizaron 4 réplicas para cada concentración y cada droga. También se prepararon 4 réplicas blanco con medio RPMI y parásitos (sin las soluciones de drogas) y 4 réplicas con el medio RPMI y con cada solución de droga, a las dos concentraciones y sin parásitos, con el fin de evaluar la adhesión de las drogas a las paredes del vidrio de los tubos.

Todas las réplicas fueron incubadas a 37 °C en baño María durante 15 minutos y otro set completo de réplicas se incubó durante 3 horas. Al finalizar estos períodos de incubación, los parásitos fueron lavados minuciosamente 3 veces en solución salina, luego fueron secados en un filtro de papel grueso y transferidos a microtubos. Se congelaron a -20 °C hasta su procesamiento por HPLC, según los métodos descriptos anteriormente.

2.5.2. Análisis estadístico

Se calcularon las medias y desvío estándar para cada concentración y se compararon mediante el Test de Student. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados con significancia estadística. Se utilizó el paquete estadístico InStat 3.0 Software (Graph Pad Software, CA, USA).

2.6. Expresión de transportadores celulares proteicos en *H. contortus*

Luego de la eutanasia de los corderos seleccionados, al comienzo de la necropsia parasitológica, se seleccionaron especímenes de *H. contortus* hembra los que se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y posteriormente se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. También se almacenaron especímenes de *H. contortus* susceptible para ser procesados como control positivo.

2.6.1. Aislamiento y cuantificación de ARN

Para la extracción de ARN se tomaron 30 mg de parásitos (*H. contortus*) congelados provenientes de los animales de los grupos tratados y del grupo control y se utilizó el reactivo de Trizol para la extracción del ARN total (ARNt: ARNrribosomal, ARNmensajero y ARNtransferencia) mediante el protocolo descrito por sus elaboradores (Invitrogen). Este proceso consistió en macerar 30 mg de parásitos en un mortero con N₂ (l). El producto de esta homogenización se transfirió a un eppendorf que contenía 1ml de Trizol y se completó la homogenización mediante el pasaje por aguja y jeringa. Las muestras fueron purificadas mediante un proceso de extracción con cloroformo que consistió en el agregado 200 µl de cloroformo a cada muestra, se agitó vigorosamente con vortex durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm a una temperatura de 4°C. De esta solución se colectó la fase acuosa, donde el ARN permanece soluble y se transfirió a un eppendorf para precipitar el ARN adicionando 500 µl de isopropanol al 100 %. Las muestras se incubaron a 80°C durante 15 minutos y se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos más. El botón resultante se lavó con 1 ml de etanol a 75 % en agua y se re suspendió con vortex. Nuevamente las muestras se centrifugaron una velocidad de 7500 rpm; luego el botón se resuspendió en 20 µl de agua y se incubó en baño María a una temperatura de 55-60 °C por 5 minutos para lograr la completa disolución del ARN obtenido. Posteriormente, el ARN se llevó a hielo o se congeló a -70°C hasta su utilización.

La concentración del ARN obtenido y el grado de su pureza se determinaron mediante la utilización de un nanodrop y corrida electroforética en agarosa al 0,8%.

2.6.2. Transcripción reversa

La transcripción reversa es una reacción que consiste en la síntesis de ADN monocatenario o complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN monocatenario catalizada por la enzima

transcriptasa reversa. Para llevar a cabo esta reacción se utilizó un Kit comercial (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit- Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, en tubos eppendorf de 0,5 ml se agregaron 6 µl de esta mezcla, 2 µg de tRNA y agua suficiente para un volumen final de 20 µl. La reacción de síntesis de ADNc se realizó en un termociclador convencional siguiendo las instrucciones de termociclado provistas por el proveedor. El ADN complementario fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

2.6.3. PCR en Tiempo Real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en la amplificación específica de un segmento de ADN de interés. De esta manera se obtiene, como producto final de la reacción de amplificación, un gran número de copias del segmento de ADN de interés.

Las secuencias blanco de ARNm de *H. contortus* y los genes de referencia fueron obtenidos del genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los primers utilizados para el análisis de la expresión y cuantificación de Gp-P2 fueron diseñados utilizando el programa Primer Express™ Software 2.0 (Applied Biosystems) basados en las secuencias publicadas por Xu *et al.* (1998) para Gp-P2. Nombre del gen: Glicoproteína P2, N° Acceso a GenBank AF003908.1, Primer Forward 5'CGGCAGCAGATCTCATGGT-3' y Reverse 5' TCGGTTAGACGAGCTGTGAGATT-3', con un tamaño de producto de 61 pares de bases. El juego de primers utilizados para la amplificación del ARNm de la β-actina de *H. contortus* fue obtenido de las secuencias publicadas por Kotze y Bagnall (2006). N° Acceso al GenBank DQ080917.1, primer Forward 5'GCTCCCAGCACGATGAAAA-3' y Reverse 5'ACCAATCCAGACAGAGTATTTG-3' con un producto de amplificación de 66 pares de bases. Cada juego de primers fue optimizado en un rango de 200-500 nM para identificar la concentración de primers que amplifica el fragmento de ADN de interés con la mayor eficiencia. Las corridas de PCR en tiempo real se realizaron en un ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem). Cada una de las reacciones fue preparada con una mezcla de reacción con las siguientes proporciones: 10 µl de PCR SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 2 µl de cada juego de Primers ACT o Gp-P2 (200 nM), 1 µl de ADNc diluído 1:250 y 7 µl de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 20 µl por reacción. Se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pocillos y cada muestra se procesó por duplicado.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: pre incubación a 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, luego 95 °C por 15 segundos (desnaturalización) y 60 °C por 1 minuto (extensión). Se

realizaron 40 ciclos de desnaturalización y extensión. Finalmente se realizó la curva de melting para chequear la formación de un único producto de amplificación.

2.6.3.a. Validación de la eficiencia de la PCR en Tiempo Real

Las curvas de validación fueron realizadas con cantidades decrecientes de ADNc en pool diluidas a intervalos de 5 veces para evaluar la eficiencia de la PCR en tiempo real y los valores aceptables fueron los recomendados por la guía de ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem S.A.).

Para medir la expresión de Gp-P2 la cuantificación relativa de ARNm se llevó a cabo por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). En donde $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Gp-P2} - Ct_{actina})_{tiempo\ x} - (Ct_{Gp-P2} - Ct_{actina})_{tiempo\ 0}$. Siendo, Ct (Thresold cycle) o ciclo umbral, aquel que indica el número fraccional de ciclo en donde la cantidad del gen blanco amplificado alcanza un umbral prefijado. El tiempo x, es un tiempo señalado y el tiempo 0 representa 1x la expresión del gen blanco (Gp-P2) normalizado con β actina.

2.6.4. Análisis estadístico

La media, desvío estándar y coeficiente de variación se calculó para cada momento y para las muestras por duplicado. Se compararon las medias mediante el Test de Student y se consideraron significativas las diferencias con $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico InStat 3.0 Software (Graph Pad Software, CA, USA).

2.7. Bienestar Animal

Todos los procedimientos experimentales involucraron el trabajo con animales de experimentación (ovinos), y se realizaron siguiendo normas internacionalmente aceptadas en relación a bienestar animal. Los trabajos realizados estuvieron aprobados por el Comité de ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA y de la CICUAE del CeRBAS

Capítulo III

SECCIÓN EXPERIMENTAL I

Caracterización *in vivo* de factores que afectan la relación entre concentraciones en el sitio de localización parasitaria, concentraciones en el parásito “blanco” y eficacia antihelmíntica para diferentes lactonas macrocíclicas.

3.1. Introducción

Las LMs pueden ser administradas en los ovinos por vía oral, intraruminal, subcutánea e intramuscular dependiendo del fármaco. La vía de administración y la formulación afectan en forma significativa la farmacocinética de la droga. Luego de la administración parenteral, se obtiene una mayor disponibilidad plasmática, y una mayor persistencia de concentraciones comparado con la vía oral (Marriner *et al.* 1987; Imperiale *et al.* 2004). Esto permite una mayor persistencia de la actividad antiparasitaria contra nematodos y mejor eficacia contra ectoparásitos (Baggot y McKellar, 1994).

La eficacia de IVM en los primeros años de su aparición en el mercado veterinario fue muy elevada contra diferentes géneros de nematodos gastrointestinales más allá de la vía de administración utilizada. Así fue como Borgsteede (1993) observó que la eficacia original de IVM administrada por vía oral contra nematodos susceptibles fue similar contra los nematodos abomasales y levemente superior contra los nematodos intestinales, comparado con la administración por vía SC. Sin embargo, años más tarde, en presencia de nematodos resistentes se obtuvo un aumento significativo en la actividad farmacológica luego de la administración oral de ABM y MXD comparado con la administración subcutánea en corderos (Alka *et al.* 2004; Gopal *et al.* 2001). Los fundamentos de esta observación clínica son desconocidos y en este trabajo de tesis se profundizó el estudio con el fin de dilucidar si estas diferencias tienen una respuesta de base farmacológica.

Por otra parte, si bien se considera que las diferentes LMs actúan a través del mismo mecanismo de acción, con la aparición de aislamientos resistentes se reportaron diferencias en la eficacia entre diferentes moléculas de la familia. Diferentes patrones de eficacia fueron descritos para IVM, ABM y MXD en ovinos parasitados con nematodos resistentes (Barnes *et al.* 2001; Vickers *et al.* 2001; Alka *et al.* 2004). A pesar de que estos compuestos pertenecen a dos familias diferentes de

LMs, tienen algunas propiedades fisicoquímicas y farmacológicas en común, como también ejercen su efecto antiparasitario a través del mismo mecanismo de acción. Fueron descritas algunas diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas entre IVM y MXD (Lanusse *et al.* 1997; Molento *et al.* 2004; Njue *et al.* 2004) que pueden ser relevantes para explicar su efectividad diferencial contra ciertos nematodos resistentes (Prichard *et al.* 2012).

Existen numerosas estrategias propuestas para minimizar o revertir el impacto de la resistencia a los antihelmínticos en el control de nematodos (Leathwick y Hosking, 2009; Leathwick, 2012). Sin embargo las estrategias deben estar destinadas a incrementar la exposición de los parásitos a los fármacos antihelmínticos ya que desde el punto de vista farmacológico, los antihelmínticos necesitan tener la mejor oportunidad para actuar en su sitio específico de acción sobre los nematodos (Hennessy, 1997), el tiempo de exposición del parásito a la droga activa así como el nivel de concentración son determinantes para la eficacia y/o persistencia de todos los antihelmínticos utilizados en rumiantes (Lanusse *et al.* 2015).

La caracterización de disposición plasmática de las LMs ha sido ampliamente descrita (Barber *et al.* 2003; Imperiale *et al.* 2004; Lifschitz *et al.* 2000a y b, 2010a) y provee una importante información para un mejor entendimiento de las características farmacológicas de estos compuestos. Sin embargo, las concentraciones *in vivo* de estos compuestos requeridas para matar a los nematodos en el tracto gastrointestinal son aún desconocidas. El presente capítulo de esta Tesis estuvo dirigido a abordar esta problemática desde un enfoque integrador fármaco-parasitológico y relacionando las concentraciones encontradas en plasma, los sitios de localización parasitaria, los parásitos resistentes y la eficacia obtenida contra los mismos por las diferentes moléculas. Para ello se eligió a *H. contortus* como modelo de parásito gastrointestinal resistente para medir las concentraciones de los diferentes compuestos bajo estudio.

3.2. Hipótesis y Objetivos específicos

Se plantearon las siguientes **hipótesis**:

- a) La eficacia de las LMs contra *H. contortus* resistente puede variar de acuerdo a la vía de administración.

- b) Las concentraciones de LMs en *H. contortus* se encuentra en relación a las concentraciones alcanzadas en el sitio de localización parasitaria.
- c) Diferentes LMs presentan diferente eficacia clínica sobre *H. contortus* resistente (diferente potencia farmacológica).
- d) Existe una relación directa entre la dosis y la concentración de las LMs en los tejidos de localización parasitaria y los parásitos.

Los **objetivos específicos** de esta Sección Experimental fueron:

- a) Caracterizar la relación entre las concentraciones en plasma-tejidos de localización parasitaria-parásitos resistentes de IVM tras su administración por vía subcutánea y oral
- b) Evaluar la eficacia de IVM administrada por ambas vías contra cepas de parásitos resistentes.
- c) Correlacionar las concentraciones obtenidas en los diferentes sitios de localización parasitaria con la eficacia, evaluada por medio del recuento de huevos por gramo de materia fecal y parásitos adultos.
- d) Relacionar la eficacia comparativa de diferentes LMs contra cepas de parásitos resistentes, con sus concentraciones en plasma-tejidos de localización parasitaria y parásitos resistentes.
- c) Relacionar el nivel de dosificación de las LMs con sus concentraciones en plasma-tejidos de localización parasitaria y parásitos resistentes.

3.3. Desarrollo Experimental

La Sección experimental I comprendió tres experimentos *in vivo*. Los experimentos fueron realizados en la Reserva Experimental 8, en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) EEA Balcarce, (Lat 37° 45' S – Long 58° 18' O de Greenwich – 130 msnm) y en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA).

3.3.1. Criterios de inclusión y exclusión

Para todos los experimentos se utilizaron corderos de las majadas de cruzamiento (Romney marsh, Corriedale y Texel) de 7-8 meses de edad que fueron desparasitados con LVM fosfato 22,3% a

razón de 1 ml/22 kg de peso vivo previo a su ingreso al potrero experimental, con el fin de eliminar la carga parasitaria previa. Dicho tratamiento fue evaluado a los 10 días mediante HPG. Los animales fueron identificados con doble caravana plástica. El potrero experimental pertenece a la Reserva Experimental 8 que cuenta con un historial de control parasitario basado en el uso intensivo de antihelmínticos. La utilización de IVM fue registrada varias veces en el año y durante varios años hasta 1997 momento en el que se diagnosticó la resistencia a esta droga mediante TRCH (Entrocasso, comunicación personal) y que fue re-confirmada años después (Entrocasso *et al.*, 2008; Lifschitz *et al.*, 2010a). Los animales sin conteo de HPG, fueron alojados en el potrero experimental constituido por una pastura polifítica compuesta de festuca, agropiro y trébol rojo, con acceso libre a la aguada. Luego de 20 días del ingreso se registró la carga parasitaria mediante HPG semanalmente hasta alcanzar niveles adecuados para llevar a cabo los experimentos (promedio mayor a 1000 HPG con predominio de *H. contortus*).

3.3.2. Asignación de animales a los grupos experimentales

Siguiendo en todos los casos un diseño en paralelo, los animales experimentales se adjudicaron a distintos grupos de acuerdo a un muestreo estratificado por HPG y peso al día -1 del inicio del ensayo (día previo a los tratamientos). Posteriormente, la asignación de los tratamientos a cada grupo fue realizada mediante un diseño aleatorizado. Todos los ensayos clínicos presentaron un grupo CONTROL en el que los animales no recibieron tratamiento antihelmíntico.

A continuación se describe el desarrollo de cada experimento con sus respectivos resultados

3.4. Experimento 1:

Relación entre las concentraciones de IVM en tejidos de localización parasitaria y en *H. contortus* y la eficacia antihelmíntica: Efecto de la vía de administración.

3.4.1. Animales experimentales y tratamiento

Se utilizaron 26 animales que fueron divididos en 3 grupos homogéneos, teniendo en cuenta el peso corporal y el grado de infestación parasitaria, evaluado por medio del conteo de HPG al inicio del experimento. Se realizaron los siguientes tratamientos:

Grupo CONTROL, constituido por 6 animales, no recibieron tratamiento antihelmíntico.

Grupo SC, constituido por 10 animales, se trataron con IVM (Ivomec®, Merial Argentina) por vía SC a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Grupo IR, constituido por 10 animales, se trataron con IVM (Ivomec Oral®, Merial Uruguay) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Se administró por vía IR para garantizar la correcta dosificación, evitando pérdidas por regurgitación.

3.4.2. Toma de muestras

Para los estudios de disposición plasmática (n=6 de cada grupo), se tomaron muestras de sangre (5 ml) por punción yugular mediante tubos Vacutainer® heparinizados (Becton Dickinson, USA) a las 0, 3, 6, 9 horas y 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 y 15 días post tratamiento. Las muestras de sangre se centrifugaron a 2000g por 20 minutos y se recuperó el plasma en viales rotulados. La distribución de los fármacos en los diferentes tejidos de localización parasitaria y en los parásitos fue estudiada mediante la eutanasia de 4 animales de los grupos tratados a los tres días post-tratamiento Se colectaron muestras de contenido de abomaso e intestino delgado (yeyuno) y mucosa de abomaso e intestino delgado (yeyuno) por raspaje. También se colectaron especímenes de *H. contortus* adultos y se colocaron en tubos plásticos. La obtención de muestras de tejidos y parásitos control sin tratamiento se realizó mediante la eutanasia de un animal sin tratamiento previo. Las muestras de plasma, tejidos y contenidos del tracto gastrointestinal y de parásitos fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis por cromatografía de alto rendimiento (HPLC) como fue descrito en el capítulo de metodologías analíticas.

Para los estudios parasitológicos se calculó la eficacia mediante TRCH y también a través del TEC. Se tomaron muestras de materia fecal directamente del recto de los animales, en bolsas plásticas cerradas sin aire a los días 0, 3, 9 y 15 post tratamiento y se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis dentro de las 6 horas posteriores a su extracción. Se realizó el coprocultivo de un pool de muestras de cada grupo, previo y a los mencionados días post tratamiento. Por otra parte los animales del grupo control, grupo SC y grupo IR fueron sacrificados al día 15 post-administración para realizar el TEC. Las técnicas para el conteo de HPG, el cálculo de eficacia clínica y el coprocultivo fueron descritas en el capítulo de metodologías analíticas.

3.4.3. Resultados

3.4.3.a. Pesos y Carga parasitaria inicial

El peso inicial promedio fue de 27,2 (\pm 4,48 kg), con un promedio de 25,6 (\pm 4,2), 29,7 (\pm 3,0) y 26,2 (\pm 5,5) Kg para los grupos CONTROL, IVM-SC e IVM-IR, respectivamente. La carga parasitaria estimada por HPG arrojó promedios de 2867 (\pm 1258), 2930 (\pm 1209) y 2883 (\pm 1192) de HPG, para cada grupo respectivamente (TABLA 1).

3.4.3.b. Resultados del conteo de HPG y TRCH

Al día 15 post tratamiento los valores del conteo de HPG disminuyeron en los grupos tratados. El HPG total del grupo IVM-SC, se redujo un 45 % mientras que el del grupo IVM-IR se redujo un 52 % con respecto al grupo CONTROL (TABLA 1). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ni entre los tratamientos y el grupo CONTROL ($p \leq 0,05$).

TABLA 1: Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) expresado como media aritmética y amplitud, porcentaje de reducción del HPG (TRCH) e intervalo de confianza del 95 % (IC 95 % I-S), al día 0 y 15 post tratamiento para cada grupo.

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
HPG (amplitud)			
<i>Día 0</i>	2867 (1500 - 4980)	2930 (1560 - 4680)	2883 (1560 - 4280)
<i>Día 15</i>	4803 ^a (1800 - 11220)	2620 ^a (840 - 5400)	2320 ^a (480 - 3720)
TRCH (%)		45	52
IC 95 % (I-S)		(0 - 77)	(0 - 79)

Letras iguales: no hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Los valores de HPG se mantuvieron estables durante todo el experimento para el grupo CONTROL con promedios aritméticos de 4420, 4300 y 4803 para los días 3, 9 y 15 post tratamiento respectivamente. El grupo IVM-SC manifestó una reducción del conteo de huevos al día 3, que se mantuvo también estable durante el período experimental, con promedios de 2340, 2250 y 2620 para los días 3, 9 y 15 post tratamiento. El grupo IVM-IR, sin embargo, marcó una importante reducción al día 3, que fue aumentando progresivamente hacia el día 15, con promedios de 990, 1190 y 2320 para los días 3, 9 y 15 respectivamente (TABLA 2).

TABLA 2: Comparación del HPG entre los diferentes grupos experimentales en los 3 tiempos de muestreo, media aritmética del conteo de HPG y porcentaje de reducción del HPG.

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
HPG (% TRCH)			
<i>Día 3</i>	4420 ^a	2340 ^{ab} (47 %)	990 ^b (78 %)
<i>Día 9</i>	4300 ^a	2250 ^{ab} (48 %)	1190 ^b (72 %)
<i>Día 15</i>	4803 ^a	2620 ^a (45 %)	2320 ^a (52 %)

Letras iguales: no hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

3.4.3.c. Coprocultivos

Los cultivos de materia fecal mostraron una composición genérica al día 3 post-tratamiento similar para los grupos CONTROL e IVM-SC y compuesto por un solo género para el grupo IVM-IR (TABLA 3). Al día 9, la composición genérica fue más homogénea entre los grupos (TABLA 4) y al día 15 post tratamiento hubo un predominio relativo de *Haemonchus* spp. sobre los otros géneros, en los grupos IVM-SC e IVM-IR (TABLA 5).

TABLA 3: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR), al día 3 post-tratamiento

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
<i>Haemonchus</i> spp.	52	62	100
<i>Teladorsagia</i> spp.	6	16	0
<i>Trichostrongylus</i> spp.	20	18	0
<i>Cooperia</i> spp.	4	4	0
<i>Oesophagostomum</i> spp.	18	0	0
<i>Nematodirus</i> spp.	0	0	0

TABLA 4: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR), al día 9 post-tratamiento

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
<i>Haemonchus</i> spp.	44	80	74
<i>Teladorsagia</i> spp.	14	16	6
<i>Trichostrongylus</i> spp.	10	4	14
<i>Cooperia</i> spp.	8	0	2
<i>Oesophagostomum</i> spp.	23	0	4
<i>Nematodirus</i> spp.	1	0	0

TABLA 5: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR), al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
<i>Haemonchus</i> spp.	68	22	78
<i>Teladorsagia</i> spp.	8	18	6
<i>Trichostrongylus</i> spp.	14	58	8
<i>Cooperia</i> spp.	4	0	2
<i>Oesophagostomum</i> spp.	6	2	6
<i>Nematodirus</i> spp.	0	0	0

3.4.3.d. Conteo de parásitos adultos del tracto gastrointestinal y test de eficacia controlada

Los parásitos adultos contados en los diferentes sectores del tracto digestivo arrojaron un promedio geométrico de 4376 para el grupo CONTROL, 1300 para el grupo IVM-SC y 206 para el grupo IVM-IR. La eficacia total calculada con la media geométrica fue de 70 % y 95 % para los grupos IVM-SC e IVM-IR y de 56 % y 95 % respectivamente calculada con la media aritmética (TABLA 6).

TABLA 6: Media geométrica y aritmética, amplitud y eficacias calculadas con ambas medias para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR), en el total de parásitos del tracto gastrointestinal

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
Media geométrica	4376 ^a	1300 ^b	206 ^c
Media aritmética (amplitud)	7368 ^a (3560-11040)	3255 ^b (470-9830)	342 ^c (40-530)
Eficacia geométrica (%)		70	95
Eficacia aritmética (%)		56	95

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La sumatoria de parásitos adultos hallados en abomaso arrojó una media geométrica de 1741 en el grupo CONTROL; 829 en el grupo IVM-SC y 314 en el grupo IVM-IR, existiendo diferencias significativas solo entre el grupo CONTROL y el grupo IVM-IR ($p \leq 0,05$). La media aritmética resultó de 1865, 1012 y 361 para cada grupo respectivamente. La eficacia geométrica y aritmética contra los parásitos abomasales fue de 52 % y 46 % para el grupo IVM-SC y de 82 % y 80 % para el grupo IVM-IR respectivamente. Sólo se observaron diferencias significativas entre tratamientos en *Teladorsagia* spp. y *Trichostrongylus* spp ($p \leq 0,05$) (TABLA 7 y 8).

TABLA 7: Media geométrica de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
Media (amplitud)			
<i>Haemonchus</i> spp.	502 ^a (310-980)	597 ^a (230-1090)	300 ^a (50-520)
<i>Teladorsagia</i> spp.	790 ^a (430-1640)	36 ^b (0-850)	3 ^c (0-10)
<i>Trichostrongylus</i> spp.	322 ^a (120-690)	21 ^b (0-400)	1 ^c (0-10)
Eficacia (%)			
<i>Haemonchus</i> spp.		0	40
<i>Teladorsagia</i> spp.		95	100
<i>Trichostrongylus</i> spp.		94	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

TABLA 8: Media aritmética de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
Media (amplitud)			
<i>Haemonchus</i> spp.	575 ^a (310-980)	743 ^a (230-1090)	386 ^a (50-520)
<i>Teladorsagia</i> spp.	885 ^a (430-1640)	178 ^b (0-850)	6 ^c (0-10)
<i>Trichostrongylus</i> spp.	405 ^a (120-690)	90 ^b (0-400)	2 ^c (0-10)
Eficacia (%)			
<i>Haemonchus</i> spp.		0	33
<i>Teladorsagia</i> spp.		80	99
<i>Trichostrongylus</i> spp.		78	99

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En el intestino la media geométrica para cada tratamiento fue de 2335, 113 y 3 para los grupos CONTROL, IVM-SC e IVM-IR con eficacias de 95 y 100 % para cada tratamiento respectivamente, encontrándose diferencias significativas de los tratamientos con respecto al grupo CONTROL y entre tratamientos ($p \leq 0,05$). La media aritmética resultó de 2752, 1122 y 7 para cada grupo respectivamente y las eficacias aritméticas fueron de 59 y 100 %. La media geométrica y aritmética y las correspondientes eficacias para cada género intestinal se describen en las TABLAS 9 y 10. En todos los géneros del intestino grueso las diferencias fueron significativas entre el grupo CONTROL y los grupos tratados, sin diferencias entre tratamientos ($p \leq 0,05$).

TABLA 9 : Media geométrica, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) en el total de parásitos adultos del intestino en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
Media (amplitud)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus</i> spp.	1491 ^a (320-3230)	96 ^b (0-2430)	2 ^c (0-20)
<i>Cooperia</i> spp.	221 ^a (60-640)	5 ^b (0-290)	0 ^c
<i>Nematodirus</i> spp.	342 ^a (140-650)	8 ^b (0-1200)	1 ^c (0-10)
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum</i> spp.	54 ^a (10-140)	1 ^b (0-20)	0 ^b
<i>Chabertia</i> spp.	27 ^a (10-70)	0 ^b	0 ^b
<i>Trichuris</i> spp.	20 ^a (10-40)	0 ^b	0 ^b
Eficacia (%)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus</i> spp.		94	100
<i>Cooperia</i> spp.		98	100
<i>Nematodirus</i> spp.		96	100
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum</i> spp.		99	100
<i>Chabertia</i> spp.		100	100
<i>Trichuris</i> spp.		100	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

TABLA 10 : Media aritmética, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-SC e IVM-IR) en el total de parásitos adultos del intestino en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	IVM-SC	IVM-IR
Media (amplitud)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus</i> spp.	1888 ^a (320-3230)	770 ^b (0-2430)	5 ^c (0-20)
<i>Cooperia</i> spp.	348 ^a (60-640)	82 ^b (0-290)	0 ^c
<i>Nematodirus</i> spp.	387 ^a (140-650)	267 ^b (0-1200)	2 ^c (0-10)
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum</i> spp.	70 ^a (10-140)	3 ^b (0-20)	0 ^b
<i>Chabertia</i> spp.	25 ^a (10-70)	0 ^b	0 ^b
<i>Trichuris</i> spp.	23 ^a (10-40)	0 ^b	0 ^b
Eficacia (%)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus</i> spp.		59	100
<i>Cooperia</i> spp.		76	100
<i>Nematodirus</i> spp.		31	100
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum</i> spp.		95	100
<i>Chabertia</i> spp.		100	100
<i>Trichuris</i> spp		100	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

3.4.3.e Validación de métodos cromatográficos de IVM en plasma, tejidos gastrointestinales y parásitos

La metodología analítica de extracción físico-química, derivatización y análisis por HPLC de IVM se validó adecuadamente en las diferentes matrices bajo estudio. La identificación de IVM y ABM se realizó en base a los tiempos de retención de estándares de referencia de óptima pureza. La FIGURA 2 muestra corridas cromatográficas de un patrón de IVM en plasma, mucosa gastrointestinal y *H. contortus*. Las curvas de calibración construidas por el método de regresión lineal en los diferentes rangos para las matrices bajo estudio mostraron coeficientes de determinación entre 0,982 y 0,999. Las FIGURAS 3 y 4 muestran, a manera de ejemplo, curvas de calibración en plasma y en mucosa gastrointestinal. El porcentaje de recuperación promedio de IVM desde diferentes matrices fue de 96 % en el plasma, 84 % en el contenido gastrointestinal, 86 % en las mucosas gastrointestinales y 88 % en *H. contortus*. El límite de cuantificación establecido en plasma resultó de 0,06 ng/ml. El límite de cuantificación en los fluidos y tejidos gastrointestinales y en *H. contortus* fue de 1 ng/g. La precisión analítica obtenida luego de la extracción y análisis por HPLC de estándares de IVM estudiados en los diferentes contenidos, tejidos y parásitos resultó en un coeficiente de variación (CV) menor a 10 %, lo que indica el importante grado de reproducibilidad del método.

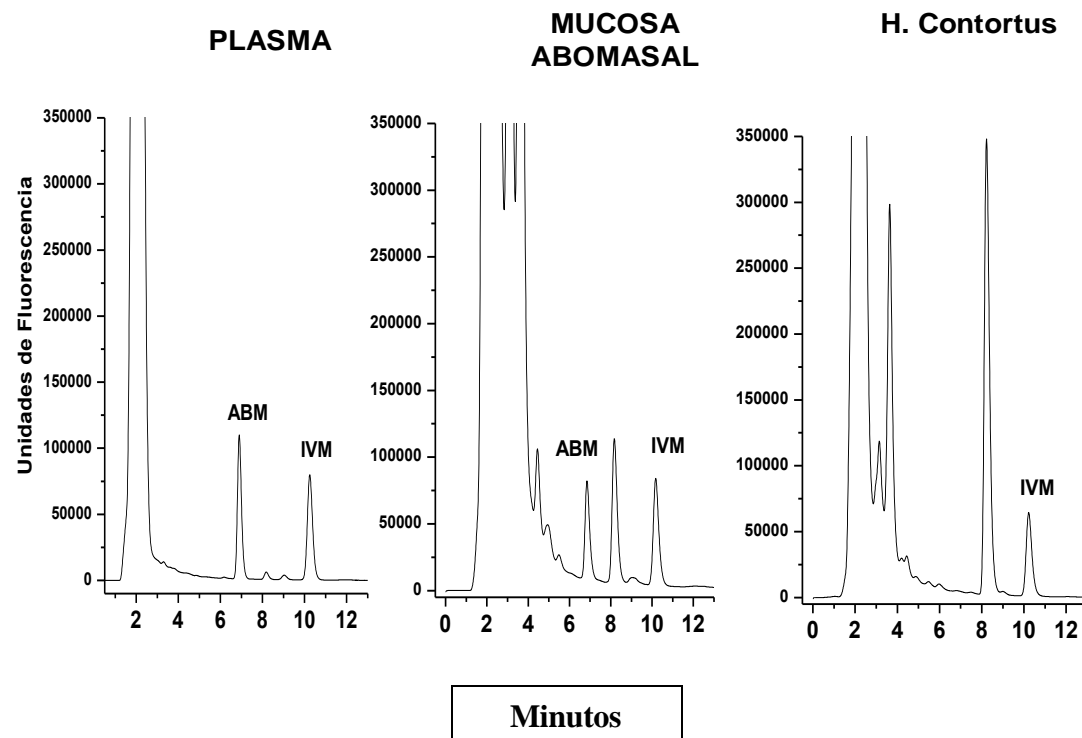


FIGURA 2: Corridas cromatográficas típicas de ivermectina (IVM) obtenidas luego de la extracción físico-química desde diferentes matrices biológicas. ABM: abamectina

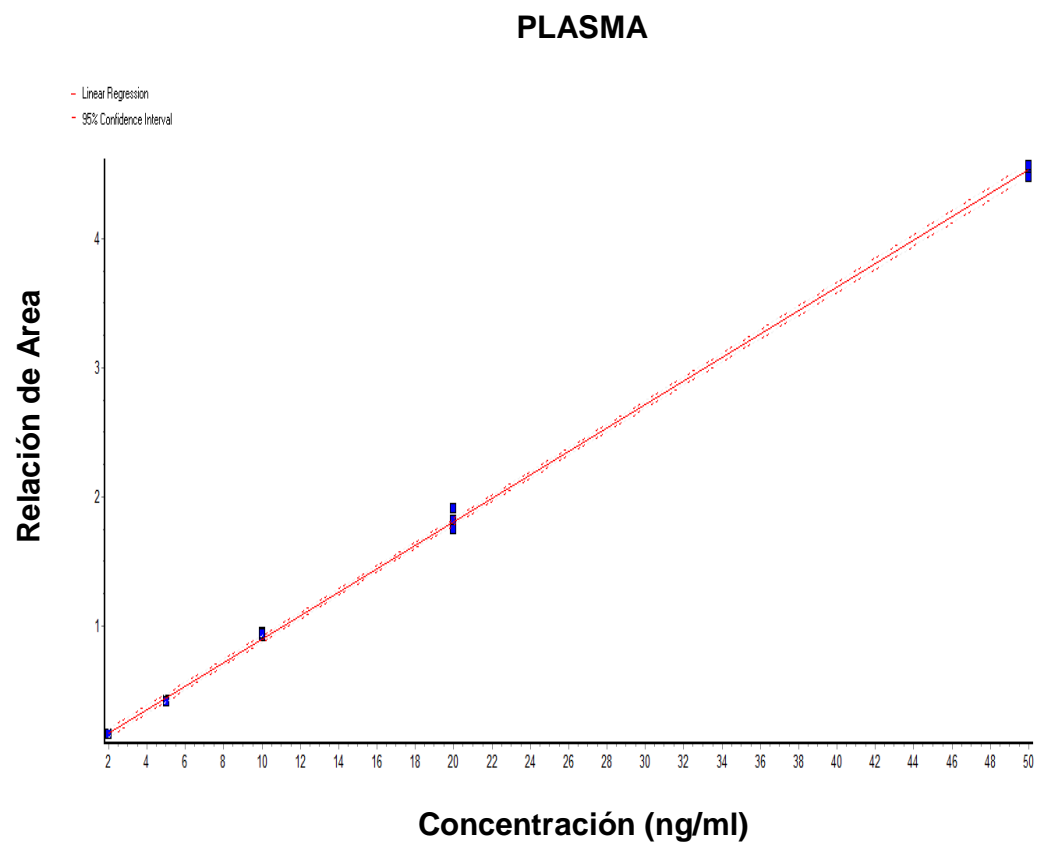


FIGURA 3: Curva de calibración obtenida para ivermectina (IVM) en plasma

MUCOSA GASTROINTESTINAL

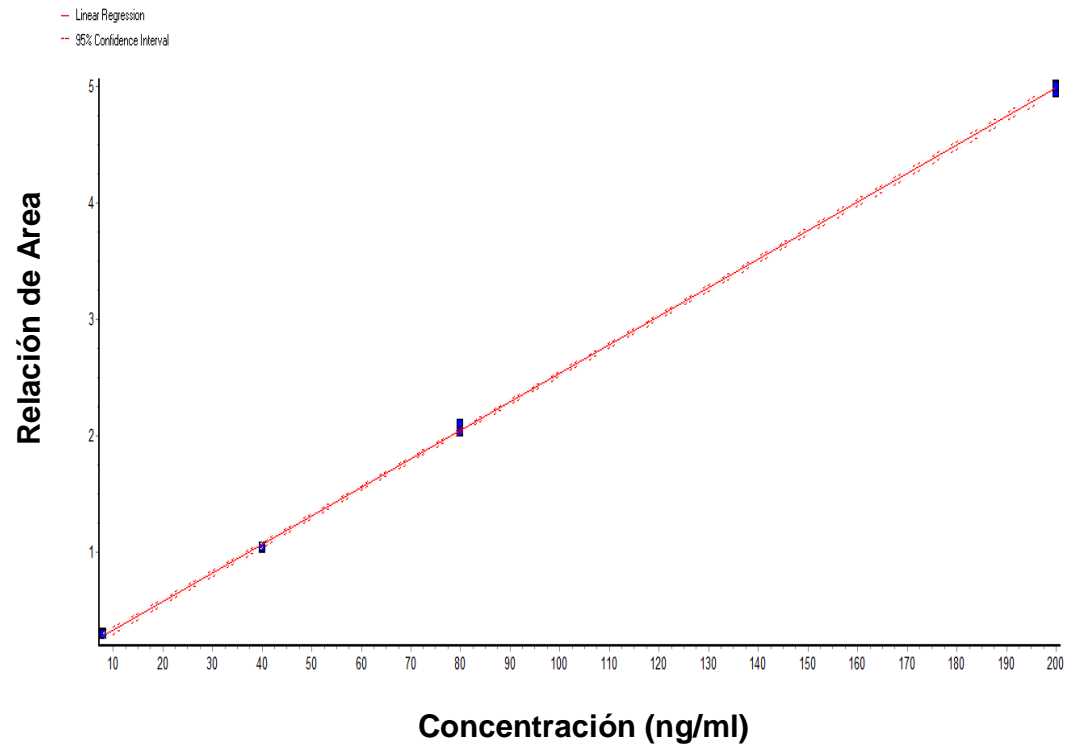


FIGURA 4: Curva de calibración obtenida para ivermectina (IVM) en mucosas gastrointestinales

3.4.3.f. Cinética plasmática de IVM

IVM fue detectada en plasma desde su administración SC e IR hasta los 15 días post-tratamiento. Las concentraciones de IVM en plasma luego de la administración SC fueron mayores en todos los puntos de muestreo a las observadas luego de la administración IR. Por ejemplo al día 2 post-tratamiento las concentraciones promedio de IVM fueron 20 ng/ml (SC) y 13,8 ng/ml (IR). Sin embargo las mayores diferencias fueron observadas luego de los 5 días post-tratamiento. Las concentraciones de IVM fueron entre 3 y 6 veces mayores tras la administración SC entre los días 5 y los 15 post-tratamiento. La FIGURA 5 muestra el perfil de concentraciones plasmáticas promedio de IVM luego de su administración por ambas vías. La FIGURA 6 muestra las concentraciones de IVM en plasma entre los 5 y 15 días post-administración por ambas vías.

Las diferencias observadas en los perfiles de concentraciones plasmáticas se reflejaron en los valores de parámetros farmacocinéticos. La exposición sistémica medida como ABC fue 2,20 veces más alta luego de la administración SC respecto a la IR ($p \leq 0,05$). Por otra parte la persistencia de concentraciones en plasma fue más prolongada luego de la administración SC lo que se reflejó en valores mayores de $T_{1/2}$ el y de TMR ($p \leq 0,05$) (TABLA 11).

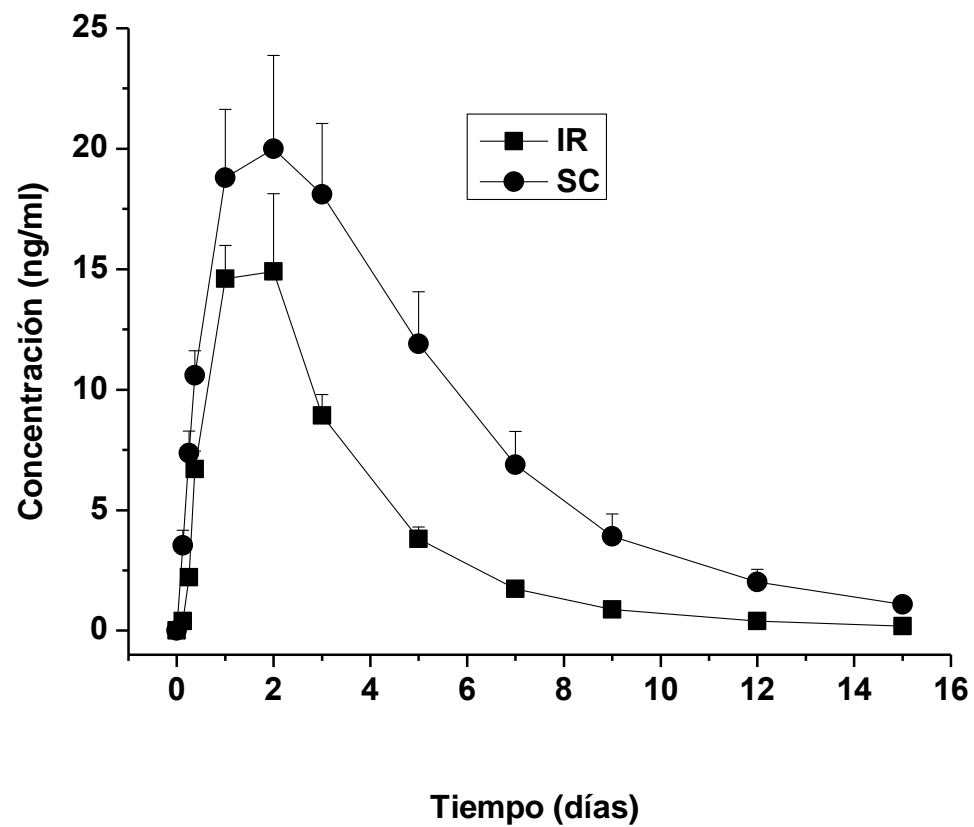


FIGURA 5: Perfil de concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de ivermectina (IVM) luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg en ovinos

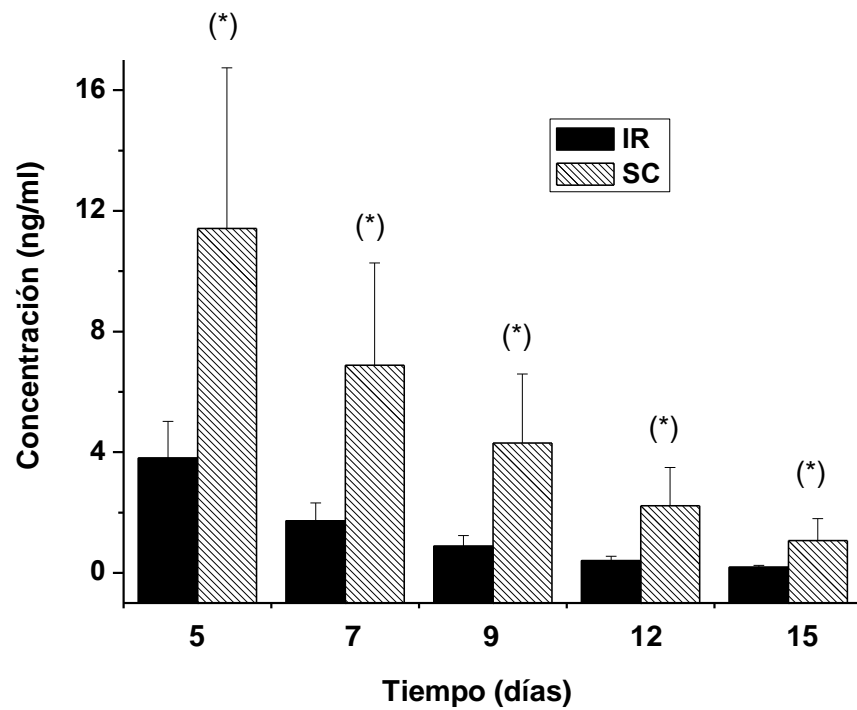


FIGURA 6: Concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de ivermectina (IVM) luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg en ovinos obtenidos entre los 5 y los 15 días post-administración. (*) Concentraciones significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

TABLA 11: Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración subcutánea (SC) e intraruminal (IR) de ivermectina (IVM) a ovinos a razón de 0,2 mg/kg.

Parámetros Cinéticos	IVM SC	IVM IR
T 1/2 ab (días)	0,54 ± 0,28	0,33 ± 0,11
Tmax (días)	1,67 ± 0,52	1,33 ± 0,52
Cmax (ng/ml)	22,2 ± 9,03	17,2 ± 7,30
ABC_{0-t} (ng.d/ml)	129 ± 41,5	58,4 ± 13,0 *
ABMC_{0-t} (ng.d²/ml)	693 ± 283	194 ± 46,1
TMR (días)	5,65 ± 2,90	3,32 ± 0,39 *
T 1/2 el (días)	3,43 ± 2,23	2,07 ± 0,23 *

T ½ ab: tiempo medio de absorción, **Tmax:** tiempo en alcanzar el pico de concentración plasmática, **Cmax:** pico de concentración plasmática, **ABC_{0-t}:** área bajo la curva concentración vs tiempo, **ABMC_{0-t}:** área bajo el momento de la curva concentración vs tiempo, **TMR:** tiempo medio de residencia, **T ½ el:** tiempo medio de eliminación, (*) Valores estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

3.4.3.g. Concentraciones de IVM en el tracto gastrointestinal y en *H. contortus*

Las concentraciones de IVM fueron cuantificadas en contenidos y mucosas gastrointestinales y en el nematodo *H. contortus* al día 3 post-tratamiento. Las concentraciones en el contenido abomasal fueron significativamente mayores luego de la administración IR (promedio de 143 ng/g; amplitud

entre 31,5 y 409 ng/g) respecto a la administración SC (promedio de 2,53 ng/g; amplitud entre 2,26 y 2,66 ng/g), Similares resultados fueron obtenidos en el contenido intestinal pero las diferencias entre las concentraciones de IVM, dependiendo la vía de administración, fueron menores. Mientras que luego del tratamiento SC la concentración promedio de IVM fue de 55 ng/g (amplitud entre 35,1 y 76,8 ng/g), las concentraciones luego de la administración IR fueron de 120 ng/g (amplitud entre 31,3 y 303 ng/g). En la mucosa abomasal las concentraciones promedio fueron 38,6 ng/g (SC) y 40,9 ng/g (IR) mientras que en la mucosa intestinal las concentraciones promedio de IVM fueron de 39,4 ng/g (SC) y 65,6 ng/g (IR). Resulta interesante remarcar que mientras las concentraciones plasmáticas promedio de los mismos animales utilizados en el estudio de distribución tisular fueron significativamente mayores luego del tratamiento SC (14,9 ng/ml) comparado con el IR (6,47 ng/ml), el patrón de concentraciones se invirtió en el tracto gastrointestinal, especialmente en los contenidos donde las concentraciones de droga fueron mayores luego de la administración IR. A manera de ejemplo mientras la relación entre la concentraciones de IVM en el contenido abomasal y en plasma luego de la administración SC fue de 0,19; luego del tratamiento IR fue de 26 ($p \leq 0,05$). Por otra parte la relación de concentraciones entre los contenidos gastrointestinales y las mucosas también estuvo influenciada por la vía de administración. El cociente contenido/mucosa abomasal fue de 0,07 (SC) y 2,97 (IR). Estas diferencias explican los resultados obtenidos al medir las concentraciones de IVM en *H. contortus*. Las concentraciones observadas en este nematodo abomasal fueron 14,4 veces mayores luego de la administración IR reflejando la importancia del medio en el cual está inmerso el parásito. Las FIGURAS 7 y 8 muestran las relaciones entre las concentraciones de IVM obtenidas en los contenidos gastrointestinales (abomasal e intestinal) y sus respectivas mucosas. La FIGURA 9 muestra las concentraciones de IVM obtenidas en *H. contortus* luego del tratamiento por ambas vías y la correlación obtenida con las concentraciones de droga en el contenido abomasal.

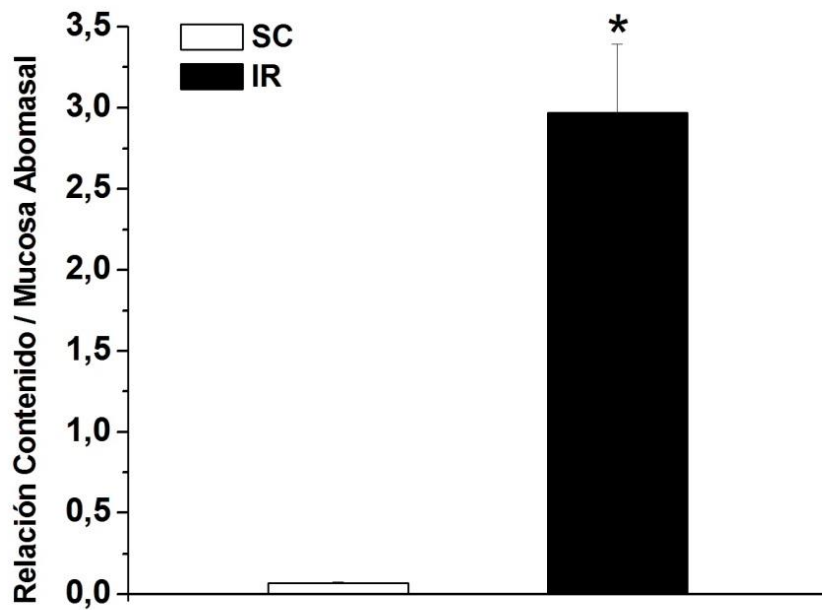


FIGURA 7: Relación entre las concentraciones promedio de ivermectina (IVM) obtenidas al día 3 post-administración en el contenido abomasal y en la mucosa luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0,2 mg/kg). (*) Concentraciones significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

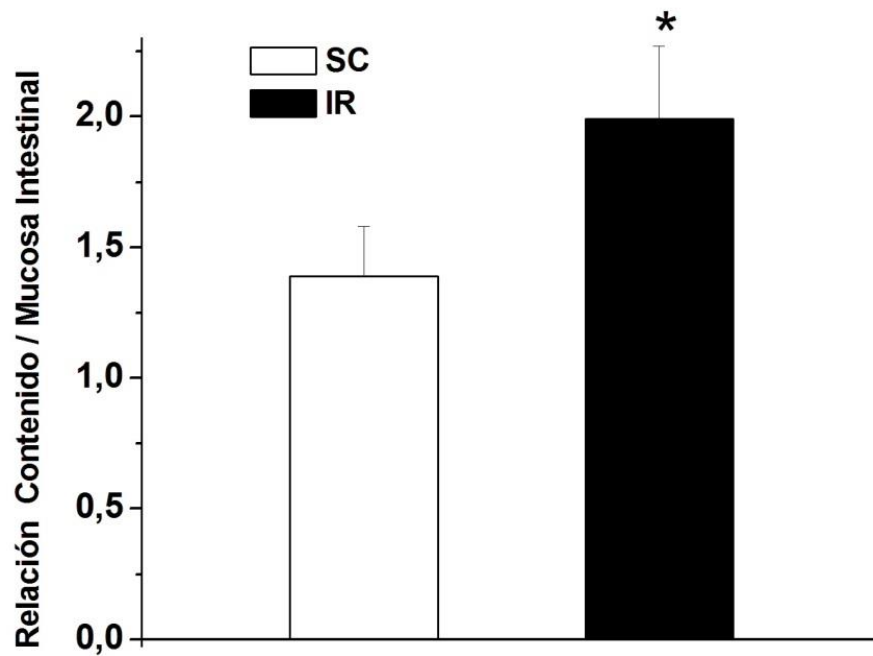


FIGURA 8: Relación entre las concentraciones promedio de ivermectina (IVM) obtenidas al día 3 post-administración en el contenido intestinal y en la mucosa luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0,2 mg/kg). (*) Concentraciones significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

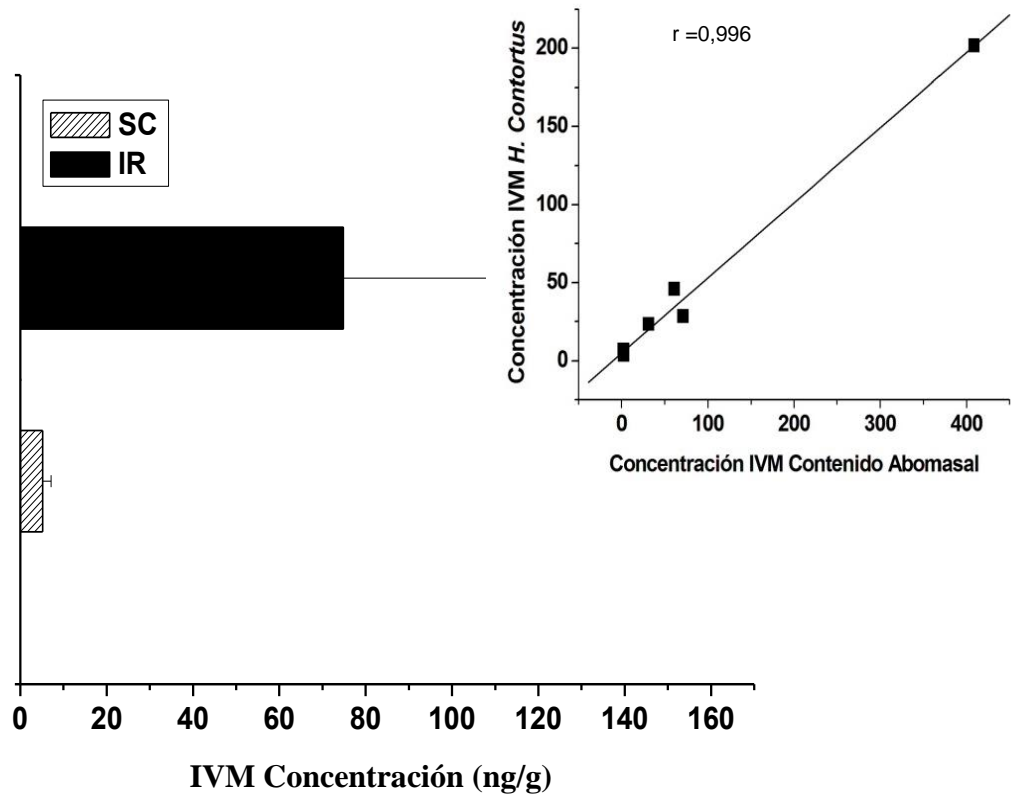


FIGURA 9: Concentraciones de ivermectina (IVM) en *H. contortus* luego de su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0,2 mg/kg) en ovinos. El inserto muestra la correlación obtenida entre las concentraciones de droga en el parásito y las obtenidas en el contenido abomasal. (*) Concentraciones significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), r: Coeficiente de correlación.

3.5. Experimento 2: Evaluación fármaco-parasitológica de la actividad antihelmíntica diferencial de IVM, ABM y MXD contra aislamientos de parásitos resistentes en ovinos.

3.5.1. Animales Experimentales y tratamiento

Se utilizaron 64 animales que fueron divididos en 4 grupos homogéneos, teniendo en cuenta el peso corporal y el grado de infestación parasitaria evaluado de acuerdo a los resultados del conteo de HPG al inicio del experimento. Se realizaron los siguientes tratamientos:

Grupo CONTROL, constituido por 10 animales, no recibieron tratamiento antihelmíntico.

Grupo MXD, constituido por 18 animales, se trataron con MXD (Cydectin®, Fort Dodge Argentina) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Grupo ABM, constituido por 18 animales, se trataron con ABM (Abamin®, Rosenbusch Argentina) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Grupo IVM, constituido por 18 animales, se trataron con IVM (Ivomec Oral®, Merial Uruguay) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Se administró por vía IR para garantizar la correcta dosificación, evitando pérdidas por regurgitación.

3.5.2. Toma de muestras

Para los estudios de disposición plasmática (n=6 de cada grupo), se tomaron muestras de sangre (5 ml) por punción yugular tal lo descrito para el experimento 1 a las 0, 3, 6, 9 horas y 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 13 días post tratamiento. La distribución de las drogas en los diferentes tejidos de localización parasitaria y en los parásitos fue estudiada mediante la eutanasia de 4 animales de los grupos tratados a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento. Se colectaron muestras de contenido y mucosa gastrointestinal y *H. contortus* adultos tal lo descrito para el experimento anterior. Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis por cromatografía de alto rendimiento como fue descrito en el capítulo de metodologías analíticas. Para los estudios parasitológicos se realizó un TRCH tomando muestras de materia fecal individual a los 0, 3, 9 y 14 días post-tratamiento para realizar los conteos de HPG en materia fecal y los coprocultivos para la identificación de géneros.

Además se realizó un TEC sacrificando los 6 animales del grupo control y los animales de cada grupo tratado (n=6) a los 14 días post-administración.

3.5.3. Resultados

3.5.3.a. Pesos y carga parasitaria inicial

El peso inicial promedio fue de 21,5 (\pm 3,04), con un promedio de 23,5 (\pm 2,2); 21,6 (\pm 3,4), 21,6 (\pm 3,2) y 21,8 (\pm 2,8) kg para los grupos CONTROL, IVM, ABM y MXD respectivamente. La carga parasitaria estimada por HPG arrojó un promedio 4679,5 con valores comprendidos entre 9780 y 1710 (TABLA 12).

3.5.3.b. Resultados del conteo de HPG y TRCH

Al día 14 post-tratamiento los valores del conteo total de HPG aumentaron en todos los grupos con diferente intensidad. El HPG total del grupo MXD, se redujo un 87 % mientras que no hubo reducción (0 %) tanto para el grupo ABM como IVM con respecto al grupo Control (TABLA 12). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de ABM e IVM, ni entre estos tratamientos y el grupo CONTROL ($p \leq 0,05$), sin embargo el grupo MXD mostró diferencia significativa frente al CONTROL y a los otros tratamientos.

TABLA 12: Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) expresado como media aritmética y amplitud, porcentaje de reducción del HPG (TRCH), intervalo de confianza (IC 95 %), al día 0 y 15 post tratamiento para cada grupo.

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
HPG (amplitud)				
<i>Día 0</i>	3325 (2010 - 4440)	3432 (2610 - 3945)	3307 (2490 - 4155)	3285 (2160 - 4200)
<i>Día 15</i>	4330 ^a (3180 - 6660)	570 ^b (240 - 960)	4460 ^a (1200 - 6000)	4620 ^a (1860 - 12480)
TRCH (%)		86,8	0	0
IC 95 % (I-S)		(78 - 92)	(0 - 34)	(0 - 53)

Letras iguales: no hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Los valores de HPG se incrementaron progresivamente durante el experimento en todos los grupos, salvo el grupo MXD. El grupo CONTROL arrojó promedios aritméticos de 2830, 3960 y 4330 para los días 6, 9 y 14 post-tratamiento respectivamente. El grupo MXD reveló una marcada reducción del conteo de huevos al día 6, que se mantuvo también estable durante el período experimental, con promedios de 560, 580 y 570 para los días 6, 9 y 14 post-tratamiento. Los grupos ABM e IVM, sin embargo, presentaron el mismo comportamiento que el grupo CONTROL con promedios de 2830, 3980 y 4460 (ABM) y 2130, 4640 y 4620 (IVM) para los días 6, 9 y 14 respectivamente.

3.5.3.c. Coprocultivos

Los cultivos de materia fecal mostraron una composición genérica pre-tratamiento compuesta por un 44% de *Haemonchus* spp., 22 % de *Teladorsagia* spp., 30 % de *Trichostrongylus* spp. y 4 % de *Oesophagostomum* spp. A los 6 días pos- tratamiento la composición genérica fue similar y

homogénea para los grupos MXD y ABM mientras que al grupo IVM se incorporó el género *Trichostrongylus*, aunque siempre con predominio de *Haemonchus* spp. (TABLA 13). Al día 9, la composición genérica fue más homogénea entre los grupos, siendo igual en todos los grupos tratados (TABLA 14) manteniéndose constante hasta el día 14 post tratamiento (TABLA 15). En todos los grupos tratados hubo un predominio relativo de *Haemonchus* spp. sobre los otros géneros .

TABLA 13: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM), al día 3 post-tratamiento

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
<i>Haemonchus</i> spp.	16	100	100	80
<i>Teladorsagia</i> spp.	44	0	0	0
<i>Trichostrongylus</i> spp.	40	0	0	20
<i>Cooperia</i> spp.	0	0	0	0
<i>Oesophagostomum</i> spp.	0	0	0	0
<i>Nematodirus</i> spp.	0	0	0	0

TABLA 14: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM), al día 9 post-tratamiento

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
<i>Haemonchus</i> spp.	52	100	100	100
<i>Teladorsagia</i> spp.	12	0	0	0
<i>Trichostrongylus</i> spp.	28	0	0	0
<i>Cooperia</i> spp.	0	0	0	0
<i>Oesophagostomum</i> spp.	8	0	0	0
<i>Nematodirus</i> spp.	0	0	0	0

TABLA 15: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM), al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
<i>Haemonchus</i> spp.	56	100	100	100
<i>Teladorsagia</i> spp.	18	0	0	0
<i>Trichostrongylus</i> spp.	22	0	0	0
<i>Cooperia</i> spp.	4	0	0	0
<i>Oesophagostomum</i> spp.	0	0	0	0
<i>Nematodirus</i> spp.	0	0	0	0

3.5.3.d. Conteo de parásitos adultos totales del tracto gastrointestinal y TEC

Los parásitos adultos contados en los diferentes sectores del tracto digestivo del grupo CONTROL, MXD, ABM e IVM y la eficacia total para cada tratamiento se muestran en la TABLA 16.

TABLA 16: Media geométrica y aritmética, amplitud, eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM), en el total de parásitos del tracto gastrointestinal

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
Media geométrica (amplitud)	7904 ^a (4540-13290)	133 ^b (20-460)	773 ^{ab} (280-1240)	1199 ^{ab} (360-3110)
Media aritmética	8572 ^a	847 ^b	225 ^b	1467 ^b
Eficacia geométrica (%)		98,3	90,2	84,8
Eficacia aritmética (%)		97,4	90,1	82,9

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La sumatoria de parásitos adultos hallados en abomaso arrojó una media geométrica de 3298 en el grupo CONTROL; 133 en el grupo MXD; 769 en el grupo ABM y 1067 en el grupo IVM, existiendo diferencias significativas sólo entre el grupo CONTROL y el grupo MXD ($p \leq 0,05$). La eficacia contra los parásitos abomasales fue de 96 %; 76,7 % y 67,7 % para los grupos MXD, ABM e IVM respectivamente. Diferencias significativas entre tratamientos sólo se observaron en el grupo MXD en el género *Haemonchus* y entre grupos tratados (MXD, ABM e IVM) y CONTROL en *Teladorsagia spp.* y *Trichostrongylus spp.* ($p \leq 0,05$) (TABLA 17). La media aritmética fue de 3700; 223; 842 y 1377 para los grupos CONTROL, MXD, ABM e IVM respectivamente. Las eficacias aritméticas fueron de 94 %; 77,3 % y 62,8 % para los grupos MXD, ABM e IVM (TABLA 18).

TABLA 17: Media geométrica de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
Media (amplitud)				
<i>Haemonchus</i> spp.	1276 ^a (760- 2500)	133 ^b (10-460)	769 ^a (280 -1230)	300 ^a (50-520)
<i>Teladorsagia</i> spp.	1709 ^a (660-4570)	0 ^b	0 ^b	5 ^b (0-1200)
<i>Trichostrongylus</i> spp.	117 ^a (20-540)	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Eficacia (%)				
<i>Haemonchus</i> spp.		89,6	39,7	20,1
<i>Teladorsagia</i> spp.		100	100	99,7
<i>Trichostrongylus</i> spp.		100	100	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

TABLA 18: Media aritmética de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
Media (amplitud)				
<i>Haemonchus</i> spp.	1417 ^a (760- 2500)	223 ^b (10-460)	842 ^a (280 -1230)	1168 ^a (50-520)
<i>Teladorsagia</i> spp.	2085 ^a (660-4570)	0 ^b	0 ^b	208 ^b (0-1200)
<i>Trichostrongylus</i> spp.	198 ^a (20-540)	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Eficacia (%)				
<i>Haemonchus</i> spp.		84,2	40,6	17,5
<i>Teladorsagia</i> spp.		100	100	90,0
<i>Trichostrongylus</i> spp.		100	100	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En el intestino la media geométrica para cada tratamiento fue de 4110; 0 ; 2 y 17 para los grupos CONTROL, MXD, ABM e IVM con eficacias de 100; 99,9 y 99,6 para cada tratamiento respectivamente, encontrándose diferencias significativas de los tratamientos con respecto al grupo CONTROL ($p \leq 0,05$). La media geométrica y eficacia para cada género intestinal se describen en la TABLA 19. La media aritmética para cada tratamiento fue de 4872; 2; 5 y 90 para los grupos CONTROL, MXD, ABM e IVM con eficacias de 100; 99,9 y 98,2 respectivamente. La media aritmética y eficacia para cada género intestinal se describen en la TABLA 20. En todos los géneros del intestino delgado y grueso las diferencias fueron significativas entre el grupo CONTROL y los grupos tratados, sin diferencias entre tratamientos ($p \leq 0,05$.)

TABLA 19: Media geométrica, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
Media (amplitud)				
Intestino delgado				
<i>Trichostrongylus</i> spp.	963 ^a (110-1960)	0 ^b	0 ^b	6 ^b (0-190)
<i>Cooperia</i> spp.	170 ^a (60-640)	0 ^b	0 ^b	3 ^b (0-90)
<i>Nematodirus</i> spp.	958 ^a (140-650)	5 ^b (0-290)	2 ^b (0-10)	5 ^b (0-10)
Intestino grueso				
<i>Oesophagostomum</i> spp.	1 (0-30)	0	0	0
<i>Chabertia</i> spp.	0	0	0	0
<i>Trichuris</i> spp.	52 (40-60)	0	0	0
Eficacia (%)				
Intestino delgado				
<i>Trichostrongylus</i> spp.		100	100	99,3
<i>Cooperia</i> spp.		100	100	98,2
<i>Nematodirus</i> spp.		100	99,8	99,5
Intestino grueso				
<i>Oesophagostomum</i> spp.		100	100	100
<i>Chabertia</i> spp.		100	100	100
<i>Trichuris</i> spp.		100	100	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

TABLA 20: Media aritmética, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD, ABM e IVM) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.

	CONTROL	MXD	ABM	IVM
Media (amplitud)				
Intestino delgado				
<i>Trichostrongylus</i> spp.	1272 ^a (110-1960)	0 ^b	0 ^b	45 ^b (0-190)
<i>Cooperia</i> spp.	1573 ^a (60-640)	0 ^b	0 ^b	23 ^b (0-90)
<i>Nematodirus</i> spp.	1968 ^a (140-650)	2 ^b (0-290)	5 ^b (0-10)	22 ^b (0-10)
Intestino grueso				
<i>Oesophagostomum</i> spp.	5 (0-30)	0	0	0
<i>Chabertia</i> spp.	0	0	0	0
<i>Trichuris</i> spp.	53 (40-60)	0	0	0
Eficacia (%)				
Intestino delgado				
<i>Trichostrongylus</i> spp.		100	100	96,4
<i>Cooperia</i> spp.		100	100	98,5
<i>Nematodirus</i> spp.		99,9	99,8	98,9
Intestino grueso				
<i>Oesophagostomum</i> spp.		100	100	100
<i>Chabertia</i> spp.		100	100	100
<i>Trichuris</i> spp.		100	100	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

3.5.3.e. Validación de métodos cromatográficos de MXD, ABM e IVM en plasma, tejidos gastrointestinales y parásitos

La metodología analítica de extracción físico-química, derivatización y análisis por HPLC de IVM, ABM y MXD se validó adecuadamente en las diferentes matrices bajo estudio. Se puso a punto un método para la múltiple detección de lactonas macrocíclicas (MXD, ABM, IVM) en la misma corrida cromatográfica usando DRM como estándar interno. La identificación de MXD, ABM e IVM se realizó en base a los tiempos de retención de estándares de referencia de óptima pureza. La FIGURA 10 muestra corridas cromatográficas de un patrón de MXD, ABM e IVM en plasma, mucosa gastrointestinal y *H. contortus*. Las curvas de calibración para MXD, ABM e IVM construidas por el método de regresión lineal en los diferentes rangos para las matrices bajo estudio mostraron coeficientes de determinación superiores a 0,99 en plasma, mucosas gastrointestinales, fluidos gastrointestinales y *H. contortus*. El porcentaje de recuperación promedio para MXD, ABM e IVM respectivamente fue de 85 %, 94 % y 96 % (plasma), 72 %, 74 % y 83 % (mucosas gastrointestinales), 96 %, 99 % y 98 % (fluidos gastrointestinales) y de 94 %, 90% y 94 % (*H. contortus*). El límite de cuantificación establecido en plasma resultó de 0,06 ng/ml y de 1 ng/g para mucosa, contenidos gastrointestinales y *H. contortus* respectivamente. La precisión analítica obtenida luego de la extracción y análisis por HPLC de estándares de MXD, ABM e IVM estudiadas en las diferentes matrices, resultó en un coeficiente de variación menor a 10 %, lo que indica el importante grado de reproducibilidad del método. Las FIGURAS 11, 12 y 13 muestran a manera de ejemplo las curvas de calibración obtenidas para los tres fármacos en las mucosas gastrointestinales.

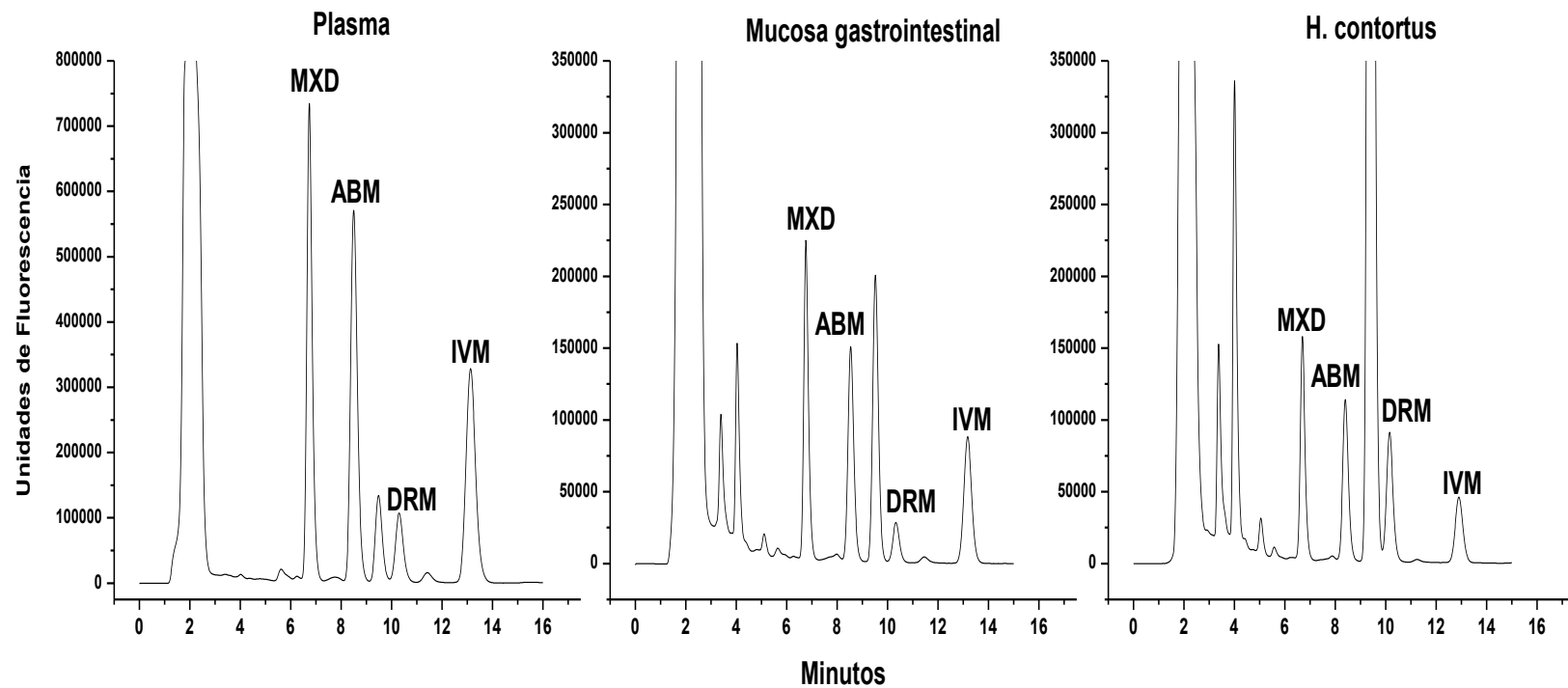


FIGURA 10: Corridas cromatográficas típicas de moxidectina (MXD) abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) luego de la extracción físico-química desde diferentes matrices biológicas. DRM: doramectina (estándar interno)

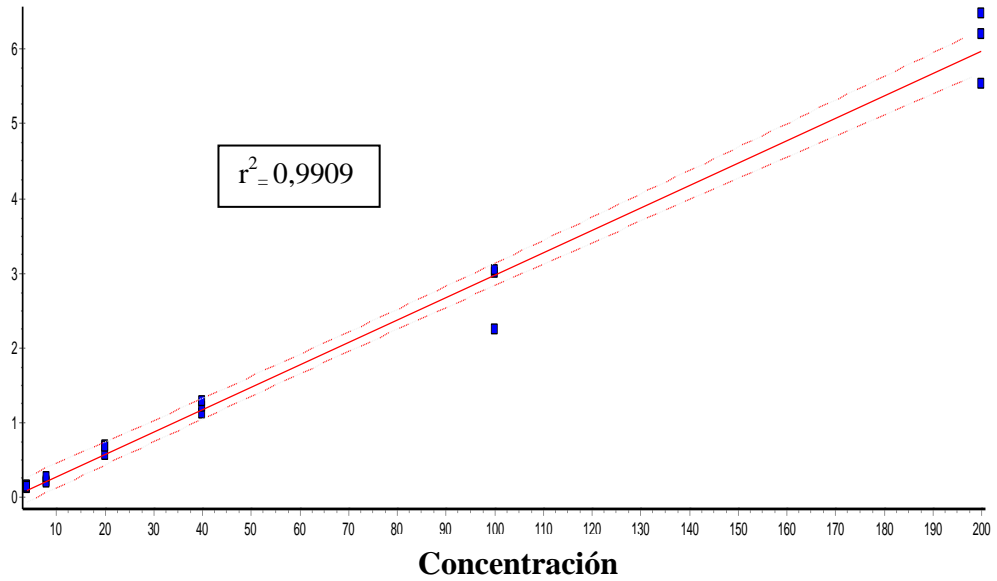


FIGURA 11: curva de calibración obtenida para moxidectina (MXD) en las mucosas gastrointestinales

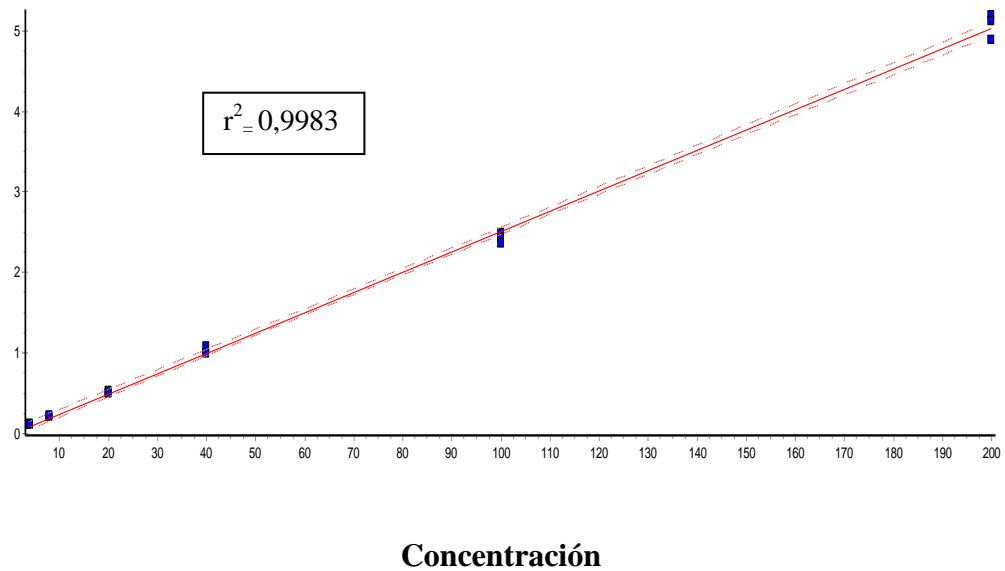


FIGURA 12: curva de calibración obtenida para Abamectina (ABM) en las mucosas gastrointestinales

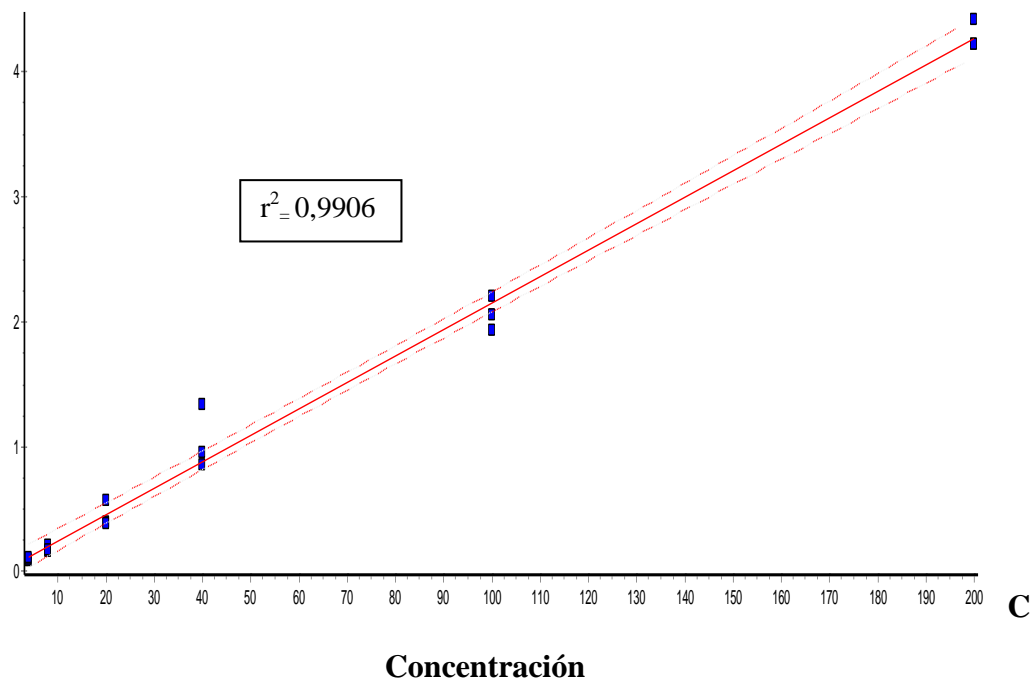


FIGURA 13: curva de calibración obtenida para ivermectina (IVM) en las mucosas gastrointestinales.

3.5.3.f. Cinética plasmática

Se detectó MXD en plasma hasta los 14 días post tratamiento luego de la administración por vía oral mientras que ABM e IVM fueron detectadas solamente hasta el día 8 post tratamiento. La FIGURA 14 muestra el perfil de concentraciones plasmáticas promedio de MXD, ABM e IVM tras su administración por vía oral. Las diferencias observadas en los perfiles de concentraciones plasmáticas se reflejaron en los valores de algunos parámetros farmacocinéticos. La persistencia de concentraciones en plasma fue más prolongada luego de la administración de MXD lo que se reflejó en mayores valores de $T_{1/2}$ el y de TMR comparado con ABM e IVM ($p \leq 0,05$). Los principales parámetros farmacocinéticos para las tres LMs se muestran en la TABLA 21 y la FIGURA 15 muestra el $T_{1/2}$ el y de TMR.

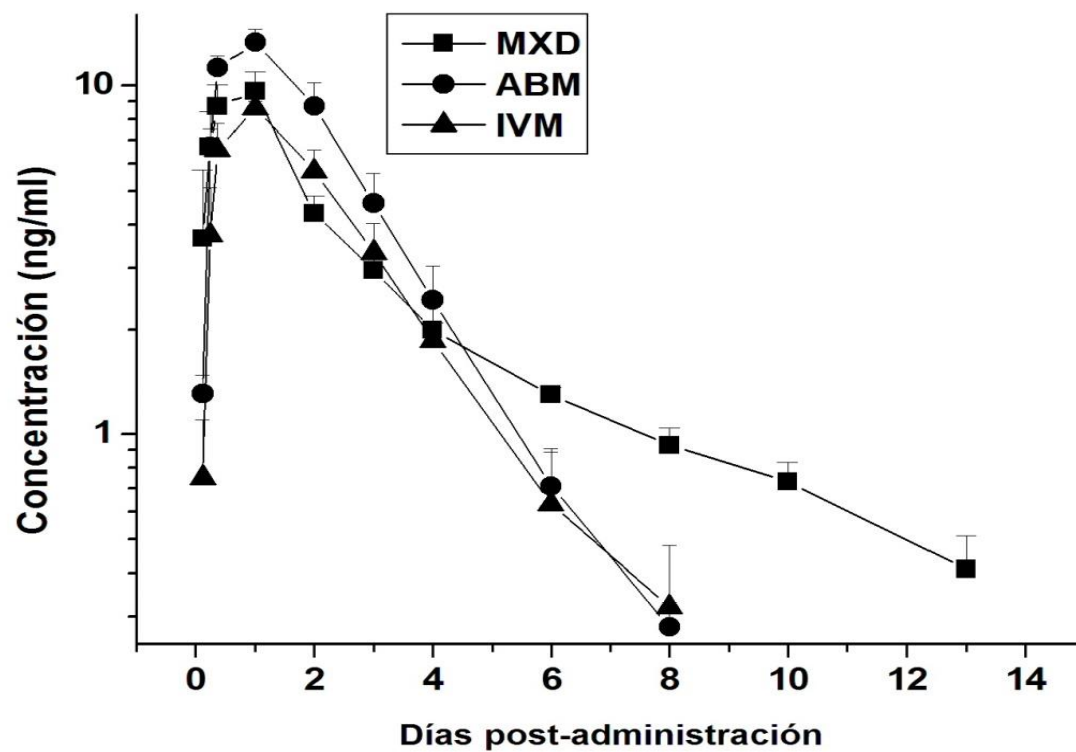


FIGURA 14: Concentraciones plasmáticas promedio y desvíos estándar de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) en función del tiempo luego de su administración por vía oral en corderos.

TABLA 21: Promedio de los parámetros farmacocinéticos plasmáticos y desvío estándar obtenidos luego de la administración intraruminal de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) a ovinos a razón de 0,2 mg/kg

Parámetros Cinéticos	MXD	ABM	IVM
T 1/2 ab (días)	0,24 ± 0,26^a	0,27 ± 0,09^a	0,27 ± 0,12^a
Tmax (días)	0,54 ± 0,37^a	0,90 ± 0,26^a	1,06 ± 0,52^a
Cmax (ng/ml)	11,3 ± 2,87^{ab}	13,6 ± 2,64^a	9,02 ± 1,47^b
ABC_{0-t} (ng.d/ml)	29,5 ± 3,87^a	34,8 ± 11,3^a	23,6 ± 7,63^a
TMR (días)	5,16 ± 2,21^a	1,52 ± 0,55^b	2,17 ± 0,61^b
T 1/2 el (días)	4,70 ± 2,17^a	1,10 ± 0,25^b	1,15 ± 0,30^b

T ½ ab: tiempo medio de absorción. **Tmax:** tiempo en alcanzar el pico de concentración plasmática. **Cmax:** pico de concentración plasmática. **ABC_{0-t}:** área bajo la curva concentración vs tiempo. **TMR:** tiempo medio de residencia. **T ½ el:** tiempo medio de eliminación. Letras diferentes: Valores estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

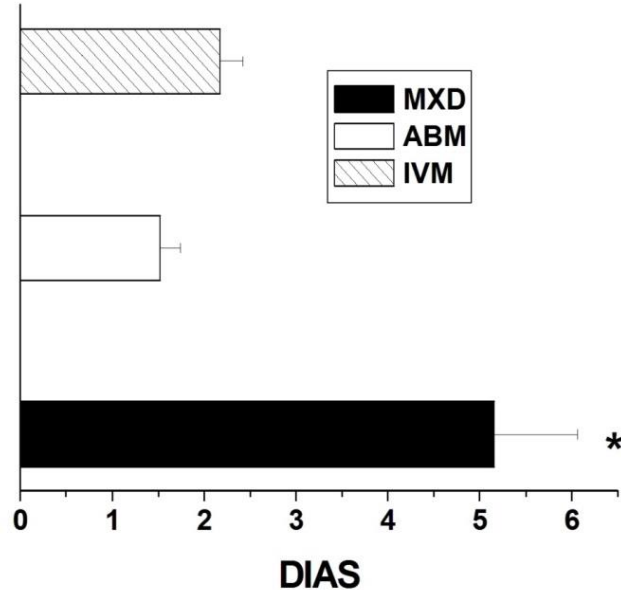


FIGURA 15: Comparación del tiempo medio de residencia (TMR) y desvíos estándar obtenidos para moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM). (*) El valor obtenido para MXD es estadísticamente diferente al de ABM e IVM ($p \leq 0,05$).

3.5.3.g. Concentraciones de LMs en el tracto gastrointestinal y en *H. contortus*

Las concentraciones de las tres LMs fueron cuantificadas en los contenidos y las mucosas gastrointestinales y en también en *H. contortus* a las 12 hs, al día 1 y día 2 post-tratamiento. En los tejidos gastrointestinales se recuperaron altas concentraciones de drogas. La concentración de las tres LMs en la mucosa y en el contenido del tracto gastrointestinal fue significativamente mayor que el hallado en el plasma. En el contenido gastrointestinal, tanto abomasal como intestinal, las concentraciones de LMs se encontraron en un rango de 452 ng/g a las 12 horas post-tratamiento hasta 32 ng/g a los 2 días post-tratamiento mientras que en las mucosas gastrointestinales el rango fue entre 231 ng/g, a las 12 horas post-tratamiento hasta 30 ng/g a los 2 días post-tratamiento.

La concentración de las tres LMs en los contenidos y las mucosas gastrointestinales fue similar a las 12 horas y 1 día post-tratamiento, sin embargo, las concentraciones de MXD fueron significativamente menores comparadas con ABM e IVM al día 2 post-tratamiento. Las

concentraciones promedio de las tres LMs en los contenidos y mucosas del tracto gastrointestinal se muestran en las TABLAS 22 y 23. En la FIGURA 16 se muestran las concentraciones de la LMs de los contenidos abomasal e intestinal comparadas con las concentraciones halladas en plasma al día 2 post-tratamiento.

TABLA 22: Concentraciones y desvíos estándar de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) en las mucosas abomasal e intestinal a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento

Concentraciones en las mucosas gastrointestinales (ng/g)						
Tiempo post tratamiento (días)	Mucosa abomasal			Mucosa intestinal		
	MXD	ABM	IVM	MXD	ABM	IVM
0,5	65,5 ± 9,74 ^a	76,8 ± 11,6 ^a	76,5 ± 9,83 ^a	231 ± 83 ^a	203 ± 11,5 ^a	198 ± 55,7 ^a
1	48,3 ± 12,7 ^a	78 ± 24,2 ^a	58,2 ± 8,75 ^a	134 ± 41,7 ^a	152 ± 12,4 ^a	117 ± 26,8 ^a
2	30,1 ± 5,80 ^a	64,6 ± 45,4 ^a	42,6 ± 4,53 ^a	57,1 ± 5,30 ^a	118 ± 85,9 ^b	128 ± 51,4 ^b

TABLA 23: Concentraciones y desvíos estándar de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) en los contenidos abomasal e intestinal a los 0,5; 1 y 2 días post tratamiento.

Concentraciones en los contenidos gastrointestinales (ng/g)						
Tiempo post tratamiento (días)	Contenido abomasal			Contenido intestinal		
	MXD	ABM	IVM	MXD	ABM	IVM
0,5	452,9 ± 118 ^a	267,4 ± 94,2 ^a	438 ± 95,2 ^a	208,1 ± 67,2 ^a	165,1 ± 40 ^a	211,6 ± 75,7 ^a
1	180,3 ± 20,6 ^a	332,1 ± 240,8 ^a	351,3 ± 94,2 ^a	98,1 ± 15,8 ^a	215,6 ± 123,4 ^a	171,5 ± 58,3 ^a
2	31,6 ± 12,9 ^a	61,3 ± 22,1 ^{ab}	125,3 ± 50,8 ^b	43,1 ± 5,84 ^a	104,1 ± 43,5 ^b	93,4 ± 20,4 ^b

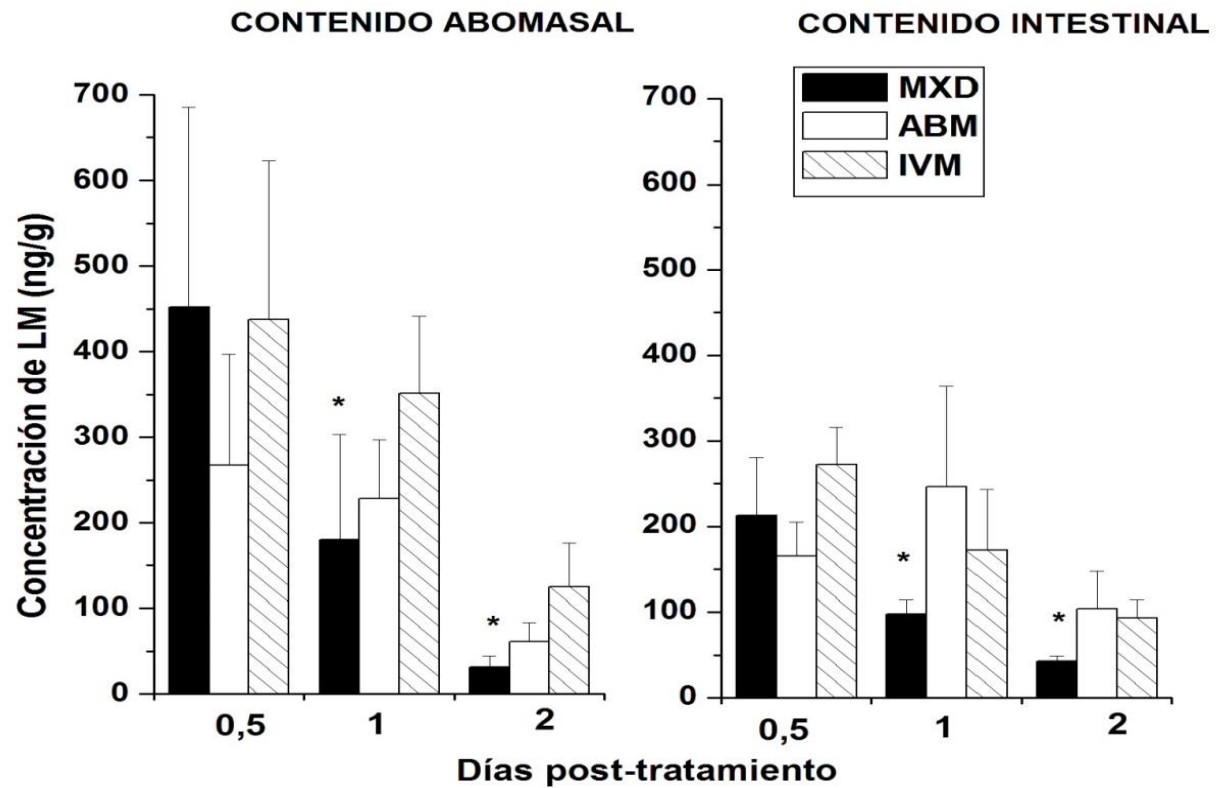


FIGURA 16: Concentraciones de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) en contenido abomasal y contenido intestinal a los 0,5; 1 y 2 días post-administración

Las concentraciones de LMs en *H. contortus* fueron caracterizadas también en diferentes tiempos post-tratamiento. Las concentraciones de las LMs cuantificadas en *H. contortus* se hallaron en un rango similar a aquellos observados en el contenido abomasal, existiendo una correlación positiva ($P = 0,0002$) entre estos valores. Al día 2 post-tratamiento se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones cuantificadas en los especímenes adultos de *H. contortus*, hallándose menores concentraciones de MXD comparado con ABM e IVM (FIGURA 17).

A pesar de haber recuperado bajas concentraciones en el contenido abomasal y las acumuladas en los parásitos, la masa total de especímenes de *H. contortus* recuperada fue significativamente menor ($P \leq 0,05$) luego de la administración de MXD al día 1 y día 2 post-tratamiento (0,13 - 0,14 g) comparado con ABM (1,13 - 1,50 g) e IVM (1,02 - 1,38 g), como se observa en la FIGURA 18.

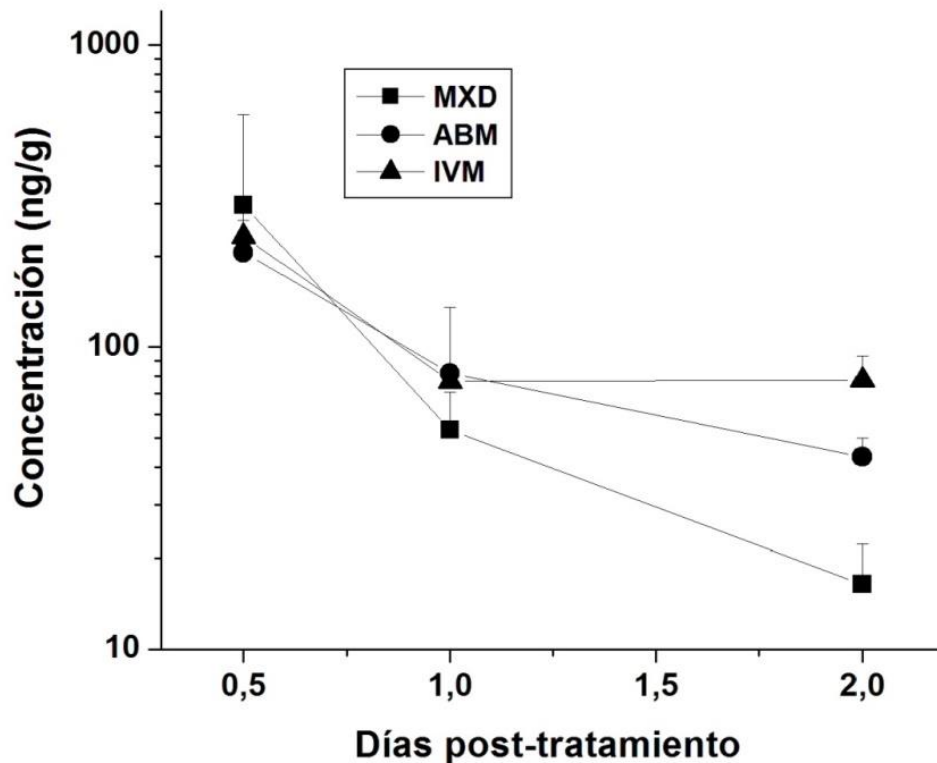


FIGURA 17: Concentraciones de moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM) en *H. contortus* a los 0,5; 1 y 2 días post-administración.

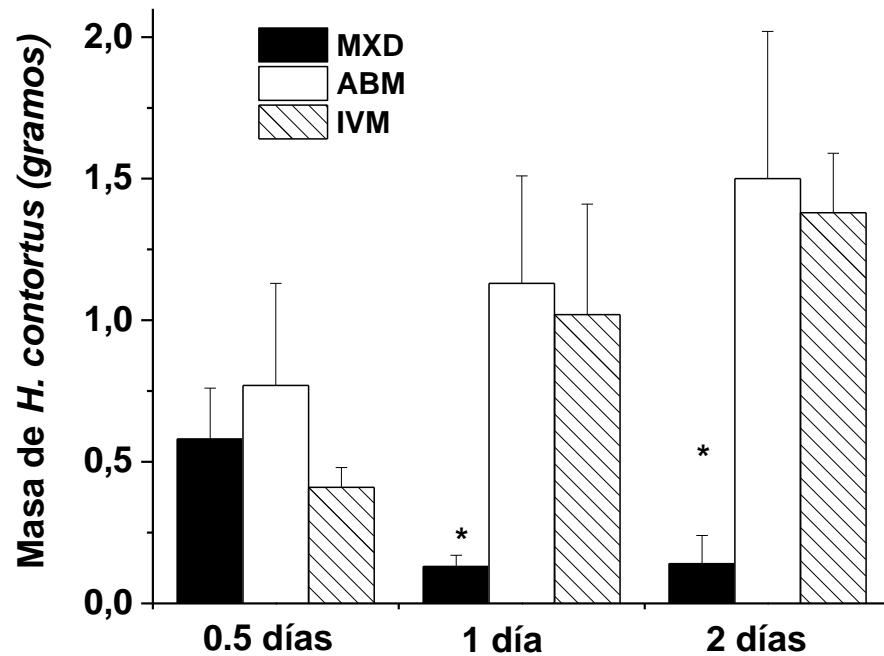


FIGURA 18: Masa total de especímenes de *H. contortus* recuperados a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento con moxidectina (MXD), abamectina (ABM) e ivermectina (IVM).

3.6. Experimento 3:

Influencia de la dosis sobre la farmacocinética y la farmacodinamia de MXD e IVM en corderos infestados con poblaciones de parásitos gastrointestinales resistentes

El presente experimento se llevó a cabo en dos fases experimentales realizadas durante dos años consecutivos. El estudio con IVM fue realizado durante el primer año mientras que el segundo año fue realizado el estudio con MXD.

3.6.1. Animales experimentales y tratamiento

Se utilizaron 52 animales (26 animales para cada fase) que fueron divididos en 6 grupos homogéneos, teniendo en cuenta el peso corporal y el grado de infestación parasitaria evaluado de

acuerdo a los resultados del conteo de HPG al inicio del experimento. Se realizaron los siguientes tratamientos:

Fase 1 (IVM)

Grupo CONTROL, constituido por 6 animales, no recibieron tratamiento antihelmíntico.

Grupo IVM 0,2; constituido por 10 animales, se trataron IVM (Ivomec Oral®, Merial Uruguay) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Grupo IVM 0,4; constituido por 10 animales, se trataron IVM (Ivomec Oral®, Merial Uruguay) por vía IR a la dosis de 0,4 mg/kg de peso vivo.

Fase 2 (MXD)

Grupo CONTROL, constituido por 6 animales, no recibieron tratamiento antihelmíntico.

Grupo MXD 0,2; constituido por 10 animales, se trataron MXD (Cydectin®, Fort Dodge Argentina) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Grupo MXD 0,4; constituido por 10 animales, se trataron MXD (Cydectin®, Fort Dodge Argentina) por vía IR a la dosis de 0,4 mg/kg de peso vivo.

Se administró por vía IR para garantizar la correcta dosificación, evitando pérdidas por regurgitación.

3.6.2. Toma de muestras

Para los estudios de disposición plasmática (n=6 de cada grupo), se tomaron muestras de sangre (5 ml) por punción yugular tal lo descrito para el experimento 1 a las 0, 3, 6, 9 horas y 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 y 14 días post tratamiento. La distribución de las drogas en los diferentes tejidos de localización parasitaria y en los parásitos fue estudiada mediante la eutanasia de 4 animales de los grupos

tratados al día 1 post-tratamiento. Se colectaron muestras de contenido y mucosa gastrointestinal y *H. contortus* adultos tal lo descrito para el experimento anterior. Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis por cromatografía de alto rendimiento como fue descrito en el capítulo de metodologías analíticas. Para los estudios parasitológicos se realizó un TRCH tomando muestras de materia fecal individual a los 0 y 14 días post-tratamiento para realizar los conteos de HPG en materia fecal y los coprocultivos para la identificación de géneros. Además se realizó un TEC realizando la eutanasia de los animales del grupo CONTROL y los animales de cada grupo tratado (n=6) a los 14 días post-administración.

3.6.3. Resultados

3.6.3.a. Pesos y carga parasitaria inicial

En la **Fase 1** el peso inicial promedio fue de 23,5 (\pm 4,33), con un promedio de 25,1 (\pm 5,4), 21,6 (\pm 4,0), 23,8 (\pm 3,5) kg para los grupos CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4 respectivamente. La carga parasitaria estimada arrojó promedios de 2970 (\pm 806,5); 3024 (\pm 902,8) y 3228 (\pm 1102,9) de HPG, para cada grupo respectivamente (TABLA 24).

Durante la **Fase 2** el peso inicial promedio fue de 19,8 (\pm 4,0) con un promedio de 20,5 (\pm 4,2); 19,4 (\pm 3,1) y 19,7 (\pm 4,9) kg para los grupos CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4 respectivamente. La carga parasitaria arrojó promedios de 2936 (\pm 1680); 4700 (\pm 3210) y 3810 (\pm 3172) de HPG, para cada grupo respectivamente (TABLA 25).

3.6.3.b. Resultados del conteo de HPG y TRCH

Fase 1 (IVM): Al día 14 el HPG total de ambos grupos tratados no se redujo con respecto al grupo CONTROL (TABLA 24). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ni entre tratamientos y el grupo CONTROL ($P \leq 0,05$).

Fase 2 (MXD): Al día 14 post-tratamiento el valor del HPG se redujo en los grupos tratados con respecto al grupo CONTROL que aumentó significativamente (TABLA 25). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados, si entre los grupos tratados y el grupo CONTROL ($p \leq 0,05$).

TABLA 24: Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) expresado como media aritmética y amplitud, porcentaje de reducción del HPG (TRCH), intervalo de confianza al 95 % (IC 95 %), al día 0 y 15 post-tratamiento para cada grupo.

	CONTROL	IVM- 0,2	IVM- 0,4
HPG (amplitud)			
<i>Día 0</i>	2970 (2100 - 4380)	3024 (1800 - 4380)	3228 (2040 – 5100)
<i>Día 15</i>	1610 ^a (1080 – 2520)	2790 ^a (840 – 3300)	2160 ^a (1020 – 3540)
TRCH (%)		0	0
IC 95 % (I-S)		(0 - 12)	(0 - 27)

Letras iguales: no hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

TABLA 25: Conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) expresado como media aritmética y amplitud, porcentaje de reducción del HPG (TRCH), intervalo del 95% de confianza (IC 95%), al día 0 y 15 post-tratamiento para cada grupo.

	CONTROL	MXD 0,2	MXD 0,4
HPG (amplitud)			
<i>Día 0</i>	2936 (601 - 5671)	4700 (720 - 8880)	3810 (660 - 9720)
<i>Día 15</i>	20856 ^a (6841 - 50761)	730 ^b (0 - 2220)	230 ^b (0 - 630)
TRCH (%)		96,5	98,9
IC 95% (I-S)		(87- 99)	(96 -100)

Letras iguales: no hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

3.6.3.c. Coprocultivos

Los cultivos de materia fecal en la Fase 1 mostraron una composición genérica al día 0 del experimento similar para todos los grupos compuesto por un solo género: *Haemonchus* spp. Al día 15 post tratamiento hubo un predominio relativo de *Haemonchus* spp. sobre los otros géneros, en el grupo CONTROL, manteniéndose monogénico en los grupos IVM-0,2 e IVM-0,4 (TABLA 26).

Durante la fase 2 los cultivos de materia fecal mostraron una composición genérica al día 0 del experimento compuesto por un 50 % de *Haemonchus* spp., 30 % de *Teladorsagia* spp. y 20% de *Trichostrongylus* spp. Sin embargo al día 15 post tratamiento el cultivo estaba compuesto por 60 %

H. contortus, 10 % *Teladorsagia* spp y 30 % *Trichostrongylus* spp., en el grupo CONTROL, y sólo por *Haemonchus* spp. en los grupos MXD-0,2 y MXD-0,4 (TABLA 27).

TABLA 26: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4), al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	IVM- 0,2	IVM- 0,4
<i>Haemonchus</i> spp.	84	100	100
<i>Teladorsagia</i> spp.	0	0	0
<i>Trichostrongylus</i> spp.	0	0	0
<i>Cooperia</i> spp.	0	0	0
<i>Oesophagostomum</i> spp.	16	0	0
<i>Nematodirus</i> spp.	0	0	0

TABLA 27: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4), al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	MXD 0,2	MXD 0,4
<i>Haemonchus</i> spp.	60	100	100
<i>Teladorsagia</i> spp.	10	0	0
<i>Trichostrongylus</i> spp.	30	0	0
<i>Cooperia</i> spp.	0	0	0
<i>Oesophagostomum</i> spp.	0	0	0
<i>Nematodirus</i> spp.	0	0	0

3.6.3.d. Cuento de parásitos adultos totales del tracto gastrointestinal y Test de eficacia controlada

Fase 1

Los parásitos adultos contados en los diferentes sectores del tracto digestivo arrojaron una media geométrica de 391, con una amplitud de 190 a 640 para el grupo CONTROL, 372 con una amplitud de 180 - 650 para el grupo IVM-0,2 y 367 con una amplitud de 150 - 740 para el grupo IVM-0,4. La media aritmética fue de 427 en el grupo CONTROL; 342 en el grupo IVM-0,2 y 418 en el grupo IVM-0,4. No hubo diferencia significativa en la cantidad total de parásitos adultos de tracto gastrointestinal entre los grupos. La eficacia total se muestra en la TABLA 28.

TABLA 28: Media geométrica y aritmética, amplitud, eficacias geométrica y aritmética para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4), en el total de parásitos del tracto gastrointestinal

	CONTROL	IVM-0,2	IVM-0,4
Media geométrica (amplitud)	391 ^a (190-640)	372 ^a (180-650)	367 ^a (150-740)
Media aritmética	427 ^a	342 ^a	418 ^a
Eficacia geométrica (%)		4,8	6,2
Eficacia aritmética (%)		19,7	2,0

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La sumatoria de parásitos adultos hallados en abomaso arrojó una media geométrica de 333 en el grupo CONTROL; 368 en el grupo IVM-0,2 y 367 en el grupo IVM-0,4, no existiendo diferencias significativas entre los grupos ($P \leq 0,05$). La eficacia contra los parásitos abomasales fue de 0 % en ambos grupos tratados. La media aritmética fue de 380 en el grupo CONTROL; 406 en el grupo IVM-0,2 y 418 en el grupo IVM-0,4. Sólo se observó diferencia significativa entre los grupos tratados y el grupo CONTROL en *Teladorsagia* spp. ($p \leq 0,05$) (TABLAS 29 y 30).

TABLA 29: Media geométrica de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.

	CONTROL	IVM- 0,2	IVM-0,4
Media (amplitud)			
<i>Haemonchus</i> spp.	282 ^a (130-580)	368 ^a (180-650)	367 ^a (150-740)
<i>Teladorsagia</i> spp.	24 ^a (0-130)	0 ^b	0 ^b
<i>Trichostrongylus</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Eficacia (%)			
<i>Haemonchus</i> spp.		0	0
<i>Teladorsagia</i> spp.		100	100
<i>Trichostrongylus</i> spp.		-	-

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

TABLA 30: Media aritmética de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.

	CONTROL	IVM- 0,2	IVM-0,4
Media (amplitud)			
<i>Haemonchus</i> spp.	325 ^a (130-580)	406 ^a (180-650)	418 ^a (150-740)
<i>Teladorsagia</i> spp.	55 ^a (0-130)	0 ^b	0 ^b
<i>Trichostrongylus</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Eficacia (%)			
<i>Haemonchus</i> spp.		0	0
<i>Teladorsagia</i> spp.		100	100
<i>Trichostrongylus</i> spp.		-	-

En el intestino la suma total de parásitos arrojó una media geométrica de 40, 2 y 0 para los grupos CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4 con eficacias de 95,9 % y 100 % para cada grupo tratado respectivamente. La media aritmética fue de 47, 5 y 0 para los grupos CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4 con eficacias de 90 y 100 % para cada tratamiento respectivamente, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al grupo CONTROL ($p \leq 0,05$). La media geométrica y aritmética y sus respectivas eficacias para cada género intestinal se describen en las TABLAS 31 y 32. Se hallaron diferencias significativas solamente en *Nematodirus* spp. y *Trichuris* spp. entre los grupos tratados y el grupo CONTROL, sin encontrarse diferencias entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

TABLA 31 : Media geométrica, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	IVM- 0,2	IVM- 0,4
Media (amplitud)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus spp.</i>	1 ^a (0-10)	0 ^a	0 ^a
<i>Cooperia spp.</i>	0	0 ^a	0 ^a
<i>Nematodirus spp.</i>	25 ^a (10-40)	1 ^b (0-12)	0 ^b
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum spp.</i>	0	0	0
<i>Chabertia spp.</i>	0	0	0
<i>Trichuris spp.</i>	8 ^a (0-40)	1 ^b (0-12)	0 ^b
Eficacia (%)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus spp.</i>		100	100
<i>Cooperia spp.</i>		-	-
<i>Nematodirus spp.</i>		97,5	100
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum spp.</i>		-	-
<i>Chabertia spp.</i>		-	-
<i>Trichuris sp</i>		91,8	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

TABLA 32: Media aritmética, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, IVM-0,2 e IVM-0,4) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	IVM- 0,2	IVM- 0,4
Media (amplitud)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus spp.</i>	1,7 ^a (0-10)	0 ^a	0 ^a
<i>Cooperia spp.</i>	0	0 ^a	0 ^a
<i>Nematodirus spp.</i>	27 ^a (10-40)	2 ^b (0-12)	0 ^b
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum spp.</i>	0	0	0
<i>Chabertia spp.</i>	0	0	0
<i>Trichuris spp.</i>	19 ^a (0-40)	2 ^b (0-12)	0 ^b
Eficacia (%)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus spp.</i>		100	100
<i>Cooperia spp.</i>		-	-
<i>Nematodirus spp.</i>		92,5	100
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum spp.</i>		-	-
<i>Chabertia spp.</i>		-	-
<i>Trichuris sp</i>		89,1	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Fase 2

El promedio de parásitos adultos contados en los diferentes sectores del tracto digestivo se describe en la TABLA 33.

TABLA 33: Media geométrica y media aritmética, amplitud y eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4), en el total de parásitos del tracto gastrointestinal.

	CONTROL	MXD-0,2	MXD-0,4
Media geométrica	50953 ^a	205 ^b	65 ^b
(amplitud)	(29050-89720)	(0-1433)	(20-184)
Media aritmética	54852 ^a	564 ^b	93 ^b
(amplitud)	(29050-89720)	(0-1433)	(20-183)
Eficacia geométrica (%)		99,6	99,9
Eficacia aritmética (%)		98,9	99,8

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La sumatoria de parásitos adultos hallados en abomaso arrojó una media geométrica de 5770 (media aritmética de 7274) en el grupo CONTROL, 200 (541) en el grupo MXD-0,2 y 33 (70) en el grupo MXD-0,4; no existiendo diferencias significativas entre los grupos tratados pero si entre estos y el grupo CONTROL ($p \leq 0,05$) considerando la media geométrica o aritmética. La eficacia contra los parásitos abomasaes calculada con la media geométrica y aritmética fueron de 96,4 (91,2) % para el grupo MXD-0,2 y de 99,3 (98,9) % para el grupo MXD-0,4 respectivamente. Diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo CONTROL se observaron en *Haemonchus* spp, *Teladorsagia* spp y *Trichostrongylus* spp. ($p \leq 0,05$) (TABLA 34).

TABLA 34: Media geométrica de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.

	CONTROL	MXD-0,2	MXD-0,4
Media geométrica (amplitud)			
<i>Haemonchus</i> spp.	3451 ^a (780-6840)	200 ^b (0-1333)	32 ^b (0-153)
<i>Teladorsagia</i> spp.	1245 ^a (270-2940)	0 ^b	0 ^b (0-4)
<i>Trichostrongylus</i> spp.	214 ^a (0-780)	0 ^b	0 ^b (0-7)
Eficacia (%)			
<i>Haemonchus</i> spp.		94,2	99,0
<i>Teladorsagia</i> spp.		100	100
<i>Trichostrongylus</i> spp.		100	100

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

TABLA 35: Media aritmética de parásitos adultos, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4) en los géneros presentes al día 15 post-tratamiento en el abomaso.

	CONTROL	MXD- 0,2	IVM-0,4
Media (amplitud)			
<i>Haemonchus</i> spp.	4117 ^a (780-6840)	541 ^b (0-1333)	68 ^b (0-153)
<i>Teladorsagia</i> spp.	1523 ^a (270-2940)	0 ^b	1 ^b (0-4)
<i>Trichostrongylus</i> spp.	634 ^a (530-780)	0 ^b	1 ^b (0-7)
Eficacia (%)			
<i>Haemonchus</i> spp.		86,9	98,4
<i>Teladorsagia</i> spp.		100	99,9
<i>Trichostrongylus</i> spp.		100	99,8

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En el intestino las medias geométricas para cada tratamiento fueron de 44825, 5 y 10 mientras que las medias aritméticas fueron de 42267, 23 y 23 para los grupos CONTROL, MXD-0,2 e MXD-0,4 respectivamente, encontrándose diferencias significativas entre los grupos tratados con respecto al grupo CONTROL ($p \leq 0,05$). Las eficacias tanto geométricas como aritméticas fueron de 99,9 % para cada grupo tratado. Las medias geométrica y aritmética y sus correspondientes eficacias para cada género intestinal se describen en las TABLAS 36 y 37, hallándose diferencias significativas solamente en *Trichostrongylus* spp y *Nematodirus* spp entre los grupos tratados y el grupo CONTROL, sin encontrarse diferencias entre los grupos tratados ($p \leq 0,05$).

TABLA 36 : Media geométrica, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	MXD 0,2	MXD 0,4
Media (amplitud)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus</i> spp.	39233 ^a (22300-57700)	4 ^b (0-40)	8 ^b (0-50)
<i>Cooperia</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>Nematodirus</i> spp.	90 ^a (0-24900)	1 ^b (0-60)	1 ^b (0-20)
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomun</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>Chabertia</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>Trichuris</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Eficacia (%)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus</i> spp.		100	100
<i>Cooperia</i> spp.		-	-
<i>Nematodirus</i> spp.		98,9	98,9
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum</i> spp.		-	-
<i>Chabertia</i> spp.		-	-
<i>Trichuris</i> spp.		-	-

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

TABLA 37 : Media aritmética, amplitud y porcentajes de eficacia para cada grupo (CONTROL, MXD-0,2 y MXD-0,4) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

	CONTROL	MXD 0,2	MXD 0,4
Media (amplitud)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus</i> spp.	34800 ^a (33500-57700)	13 ^b (0-40)	20 ^b (0-50)
<i>Cooperia</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>Nematodirus</i> spp.	7467 ^a (0-24900)	10 ^b (0-60)	3 ^b (0-20)
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>Chabertia</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>Trichuris</i> spp.	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Eficacia (%)			
Intestino delgado			
<i>Trichostrongylus</i> spp.		99,9	99,9
<i>Cooperia</i> spp.		-	-
<i>Nematodirus</i> spp.		99,9	99,9
Intestino grueso			
<i>Oesophagostomum</i> spp.		-	-
<i>Chabertia</i> spp.		-	-
<i>Trichuris</i> spp		-	-

Letras iguales: no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

3.6.3.e. Validación de métodos cromatográficos de IVM y MXD en plasma, tejidos gastrointestinales y parásitos

La validación de los métodos fue la utilizada en el experimento 2 de esta sección experimental, donde fue descripta.

3.6.3.f. Cinética plasmática

Fase 1

IVM fue detectada en plasma desde su administración hasta el día 7 post-tratamiento. Las concentraciones de IVM en plasma luego de la administración fueron mayores en todos los puntos de muestreo en el grupo IVM-0,4 con respecto al grupo IVM-0,2. Por ejemplo, al día 1 post-tratamiento las concentraciones promedio de IVM fueron 6,42 ng/ml (IVM-0,2) y 21,5 ng/ml (IVM-0,4). Sin embargo estas diferencias fueron menores a los 3 días post-tratamiento, 2,44 ng/ml (IVM-0,2) y 7,67 ng/ml (IVM-0,4), siendo prácticamente semejantes al día 7 post tratamiento con valores de 0,18 ng/ml (IVM-0,2) y 0,69 ng/ml (IVM-0,4). La FIGURA 19 muestra el perfil de concentraciones plasmáticas promedio de IVM tras su administración a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4).

Las diferencias observadas en los perfiles de concentraciones plasmáticas se reflejaron en algunos de los valores de parámetros farmacocinéticas. La exposición sistémica medida como ABC y la concentración máxima alcanzada (C_{max}) fueron 3,30 veces más altas luego de la administración a razón de 0,4 mg/kg (IVM-0,4) con respecto a 0,2 mg/kg (IVM-0,2) ($p \leq 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros ($p \leq 0,05$) (TABLA 38).

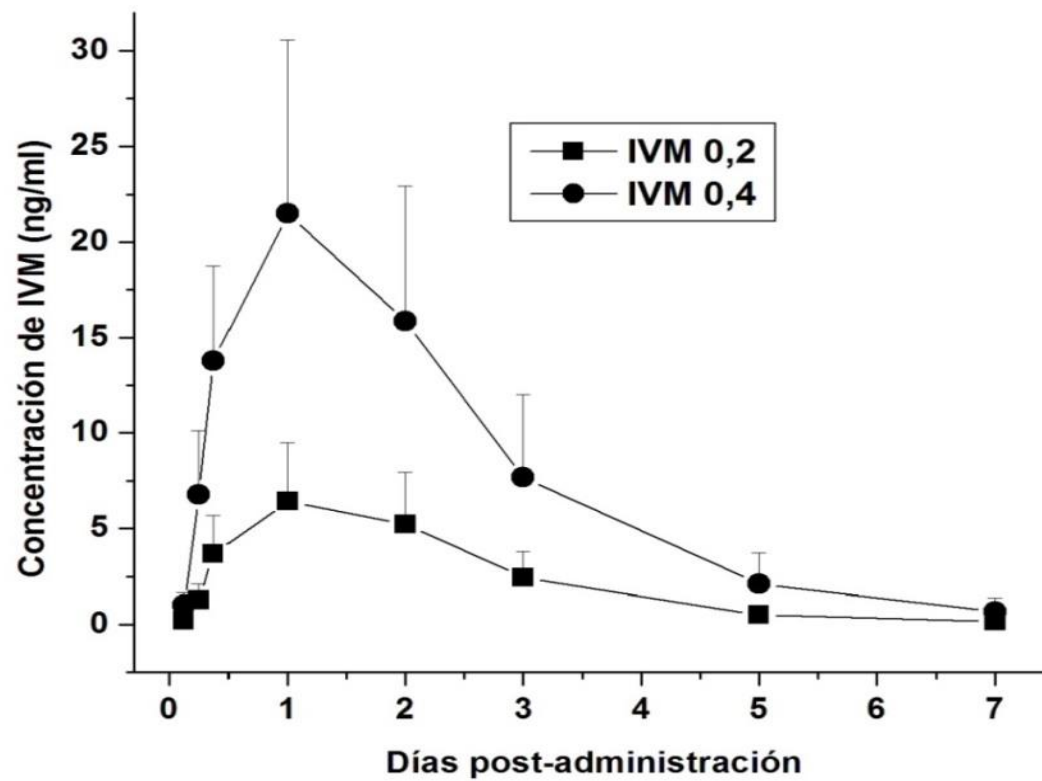


FIGURA 19: Perfil de concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de ivermectina (IVM) tras su administración por vía IR a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4) en ovinos

TABLA 38: Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración intraruminal de ivermectina a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4) a ovinos.

Parámetros Cinéticos	IVM- 0,2	IVM- 0,4
T 1/2 ab (días)	0,36 ± 0.13^a	0.31 ± 0.13^a
Tmax (días)	1.17 ± 0.41^a	0,90 ± 0.26^a
Cmax (ng/ml)	6,50 ± 2,98^a	21,4 ± 9.06^b
ABC (ng.d/ml)	17,1 ± 7,6^a	57.0 ± 27.1^b
TMR (días)	2,08 ± 0,23^a	2,04 ± 0.32^b
T 1/2 el (días)	1,01 ± 0,09^a	1,23 ± 0.21^a

T ½ ab: tiempo medio de absorción. **Tmax:** tiempo en alcanzar el pico de concentración plasmática. **Cmax:** pico de concentración plasmática. **ABC:** área bajo la curva concentración vs tiempo. **TMR:** tiempo medio de residencia. **T ½ el:** tiempo medio de eliminación. Letras iguales = no hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Fase 2:

MXD fue detectada en plasma hasta los 7 días posteriores a su administración por vía IR. En todos los puntos de muestreo las concentraciones de MXD en plasma del grupo MXD-0,4 fueron mayores con respecto al grupo MXD-0,2. Por ejemplo, al día 1 post-tratamiento las concentraciones promedio de MXD fueron 7,62 ng/ml (MXD-0,2) y 19,1 ng/ml (MXD-0,4). Sin embargo estas diferencias fueron menores a los 4 días post-tratamiento, 3,91 ng/ml (MXD-0,2) y 8,11 ng/ml (MXD-0,4) respectivamente. Siendo prácticamente semejantes al día 7 post tratamiento con valores de 0,45 ng/ml (MXD-0,2) y 0,55 ng/ml (MXD-0,4). La FIGURA 20 muestra el perfil de concentraciones plasmáticas promedio de MXD luego de su administración a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4).

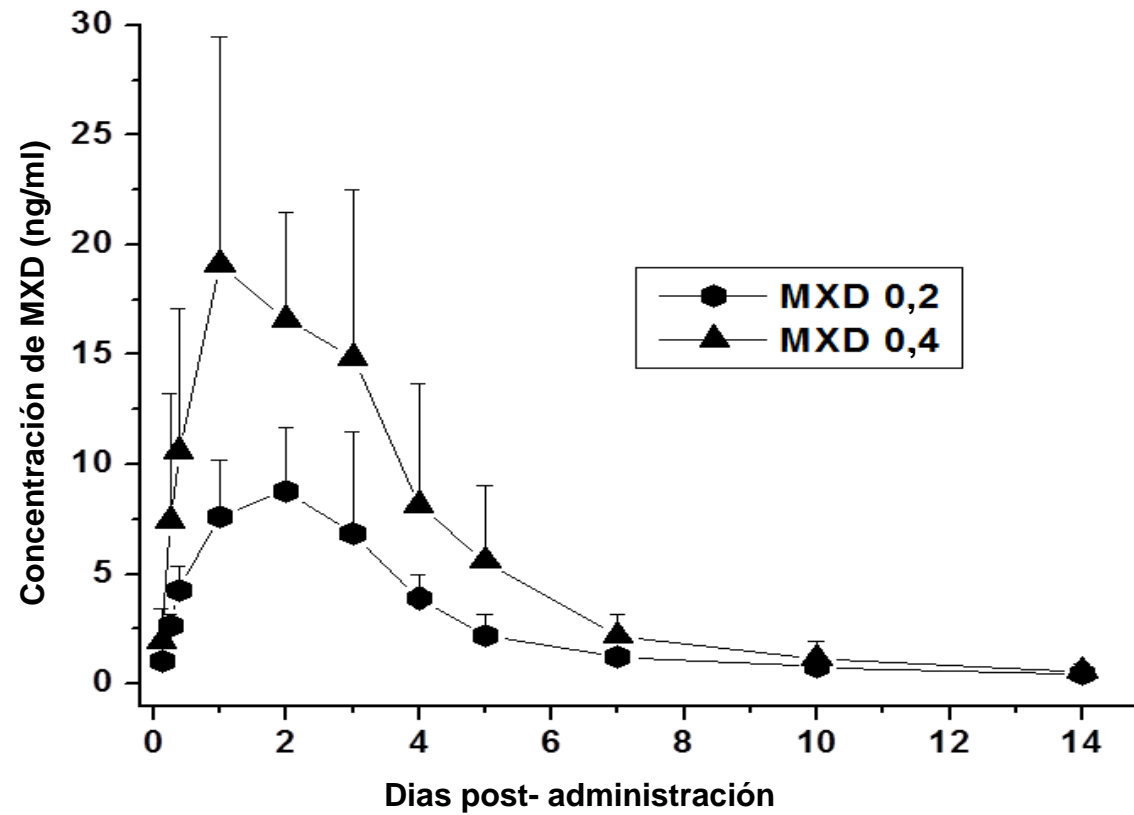


FIGURA 20: Perfil de concentraciones plasmáticas promedios (\pm DE) de MXD luego de su administración por vía IR a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4) en ovinos.

Las diferencias observadas en los perfiles de concentraciones plasmáticas se vieron reflejadas en algunos de los valores de los parámetros farmacocinéticos. La disposición sistémica medida como ABC y la concentración máxima alcanzada (C_{max}) fueron 2 y 2,3 veces más altas respectivamente, luego de la administración de MXD a razón de 0,4 mg/kg (MXD-0,4) con respecto a 0,2 mg/kg (MXD-0,2) ($p \leq 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros ($p \leq 0,05$) (TABLA 39).

TABLA 39: Parámetros farmacocinéticos (\pm DE) obtenidos luego de la administración IR de MXD a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4) a ovinos.

Parámetros Cinéticos	MXD 0,2	MXD 0,4
T 1/2 ab (días)	0,48 \pm 0,29^a	0.47 \pm 0,32^a
T_{max} (días)	2,00 \pm 0,89^a	1,67 \pm 1,03^a
C_{max} (ng/ml)	10,6 \pm 2,54^a	24,7 \pm 3,45^b
ABC (ng.d/ml)	39,7 \pm 6,06^a	81.0 \pm 16,2^b
TMR (días)	4,42 \pm 0,72^a	3,59 \pm 1,02^a
T 1/2 el (días)	2,85 \pm 0,52^a	2,17 \pm 0,59^a

Letras distintas = valores estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

T ½ ab: tiempo medio de absorción. **T_{max}:** tiempo en alcanzar el pico de concentración plasmática. **C_{max}:** pico de concentración plasmática. **ABC:** área bajo la curva concentración vs tiempo. **TMR:** tiempo medio de residencia. **T ½ el:** tiempo medio de eliminación.

3.6.3.g. Concentraciones de IVM y MXD en el tracto gastrointestinal y en *H. contortus*

Fase 1:

Las concentraciones de IVM fueron cuantificadas en contenidos y mucosas gastrointestinales y en el nematodo *H. contortus* al día 1 post-tratamiento. Las concentraciones en los tejidos y contenidos del tracto gastrointestinal fueron siempre mayores en el grupo IVM-0,4 con respecto al grupo IVM-0,2 en relación a la dosis, (TABLA 40). Las concentraciones halladas en los tejidos gastrointestinales y en *H. contortus* fueron siempre superiores a los hallados en plasma para los dos tratamientos FIGURA 21 y 23. La correlación entre la concentración de IVM hallada en *H. contortus* y en el contenido abomasal fue de ($r = 0,87$; $p \leq 0,001$) (FIGURA 22).

TABLA 40: Media aritmética (\pm DE) de la concentración de ivermectina (IVM) en plasma (ng/ml), mucosas y contenidos gastrointestinales (ng/g) y *H. contortus* (ng/g) al día 1 post-administración de IVM por vía IR en ovinos a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) 0,4 mg/kg (IVM-0,4).

	IVM-0,2	IVM-0,4
Plasma	8,4 \pm 3,62 ^a	21,8 \pm 9,76 ^b
Contenido abomasal	395 \pm 71,5 ^a	585 \pm 92,4 ^b
Mucosa abomasal	57,4 \pm 8,1 ^a	115 \pm 16,5 ^b
Contenido intestinal	254 \pm 53,4 ^a	466 \pm 159 ^b
Mucosa intestinal	116 \pm 52,9 ^a	181 \pm 11,2 ^a
<i>H. contortus</i>	102 \pm 28 ^a	251 \pm 137 ^a

Letras diferentes: diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

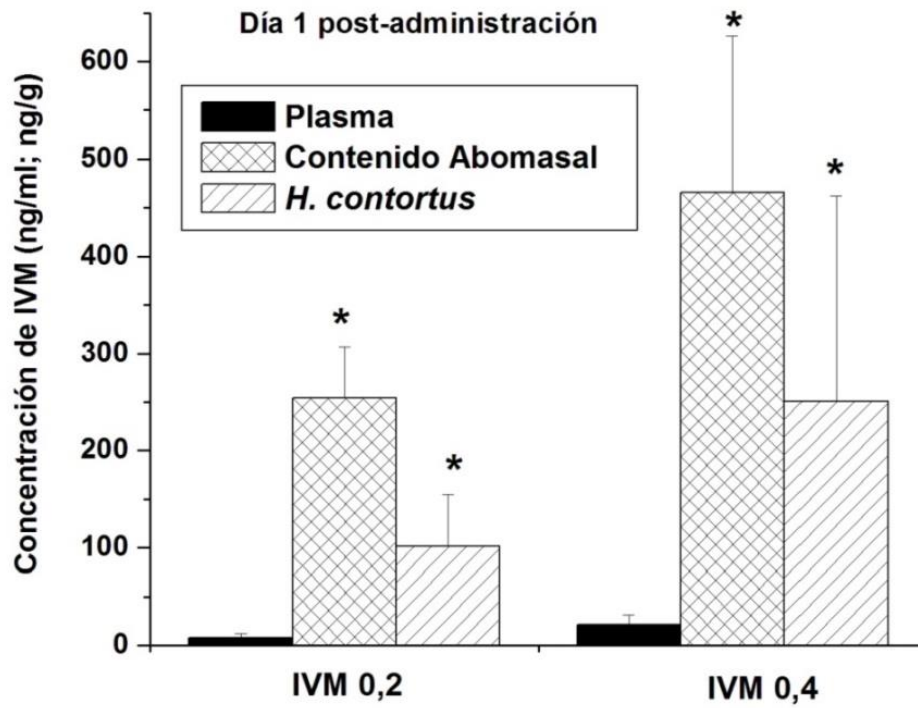


FIGURA 21: Concentraciones de ivermectina (IVM) obtenidas en *H. contortus*, contenido abomasal y plasma, luego del tratamiento por vía IR a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4) en ovinos. * diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

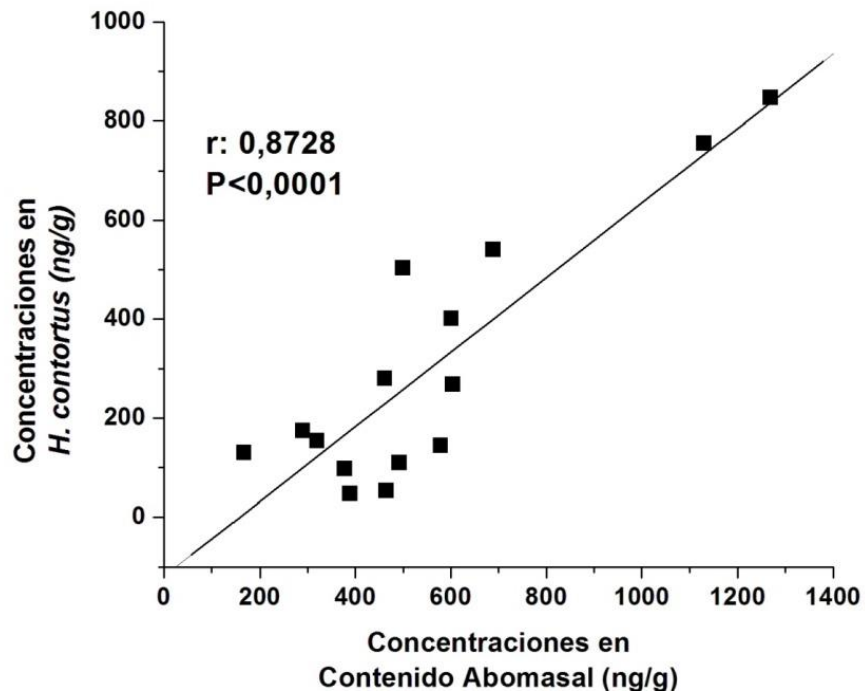


FIGURA 22: Correlación obtenida entre las concentraciones medias de ivermectina (IVM) obtenidas al día 1 post-administración entre *H. contortus* y el contenido abomasal luego de su administración por vía IR. r: Coeficiente de correlación.

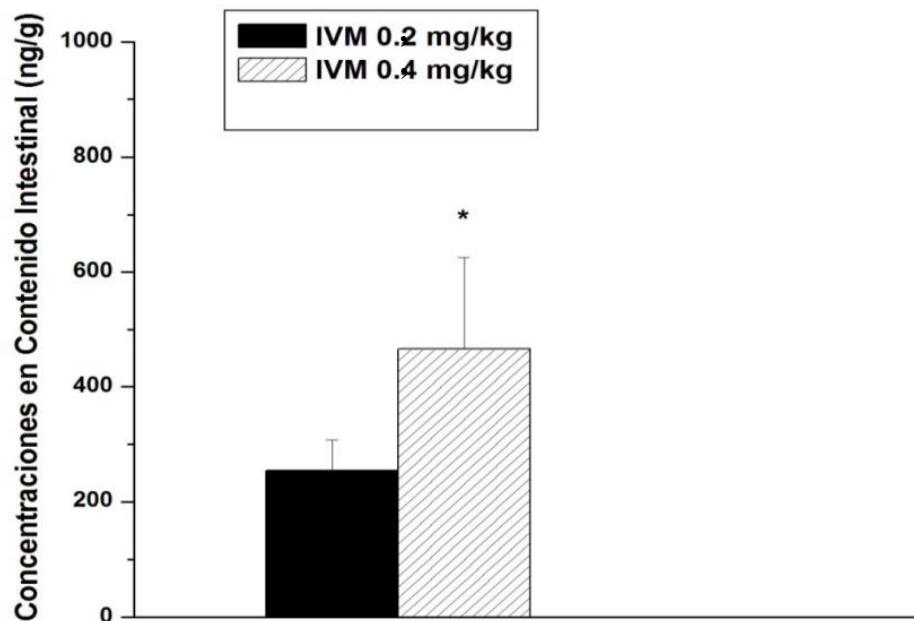


FIGURA 23: Concentraciones de ivermectina (IVM) (\pm DE) obtenidas en contenido intestinal, luego del tratamiento por vía intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg (IVM-0,2) y 0,4 mg/kg (IVM-0,4) en ovinos. * diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

Fase 2:

Las concentraciones de MXD fueron cuantificadas en los contenidos y las mucosas gastrointestinales y también en el nematodo *H. contortus* al día 1 post-tratamiento. Las concentraciones en los tejidos y contenidos del tracto gastrointestinal fueron siempre mayores y estadísticamente diferentes en el grupo MXD-0,4 con respecto al grupo MXD-0,2 en relación a la dosis (TABLA 41). Las concentraciones halladas en los tejidos gastrointestinales y en *H. contortus* fueron siempre superiores a los hallados en plasma para los dos tratamientos FIGURAS 24 y 26. La correlación entre la concentración de IVM hallada en *H. contortus* y en el contenido abomasal fue de ($r = 0,87$; $p \leq 0,001$) (FIGURA 25).

TABLA 41: Promedio (\pm DE) de la concentración de moxidectina (MXD) en plasma (ng/ml), mucosas y contenidos gastrointestinales (ng/g) y *H. contortus* (ng/g) al día 1 post-administración de MXD por vía intraruminal (IR) en ovinos a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) 0,4 mg/kg (MXD-0,4).

	MXD 0,2	MXD 0,4
Plasma	13,4 \pm 1,94^a	25,1 \pm 2,33^b
Contenido abomasal	355 \pm 155^a	910 \pm 395^b
Mucosa abomasal	73,9 \pm 24,5^a	166 \pm 84^b
Contenido Intestinal	223 \pm 116^a	560 \pm 357^b
Mucosa Intestinal	111 \pm 26,8^a	208 \pm 54,4^b
<i>H. contortus</i>	209 \pm 69^a	509 \pm 179^b

Letras diferentes: diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$)

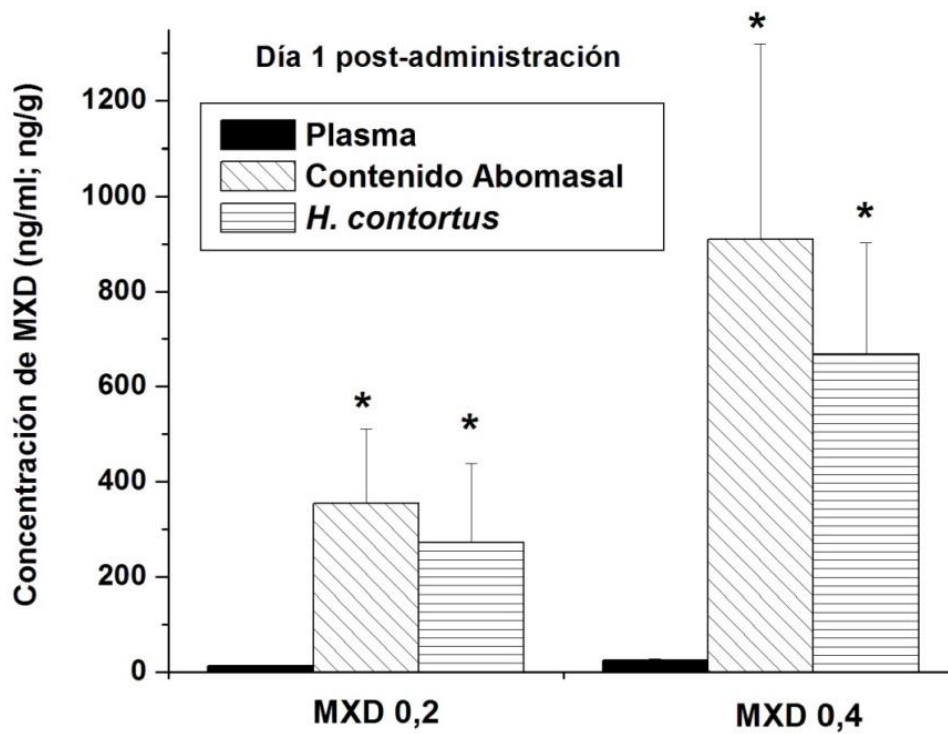


FIGURA 24: Concentraciones de moxidectina (MXD) (\pm DE) obtenidas en *H. contortus*, contenido abomasal y plasma, a 1 día post-tratamiento por vía intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4) en ovinos. * diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

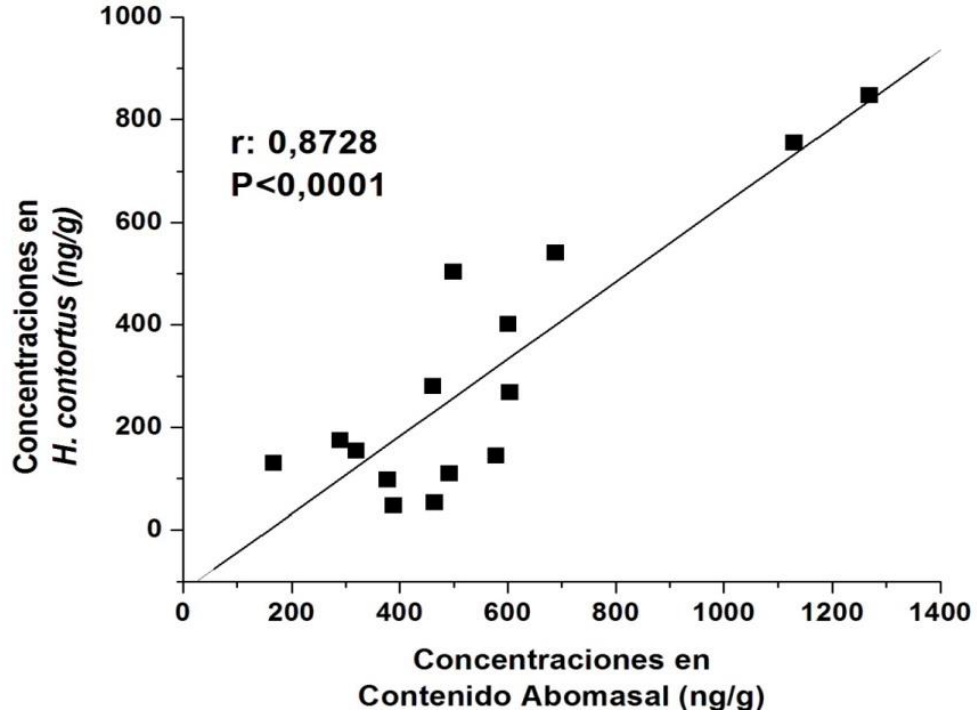


FIGURA 25: Correlación obtenida entre las concentraciones promedio de moxidectina (MXD) obtenidas al día 1 post-administración entre *H. contortus* y la concentración en el contenido abomasal luego de su administración por vía intraruminal (IR). r: Coeficiente de correlación.

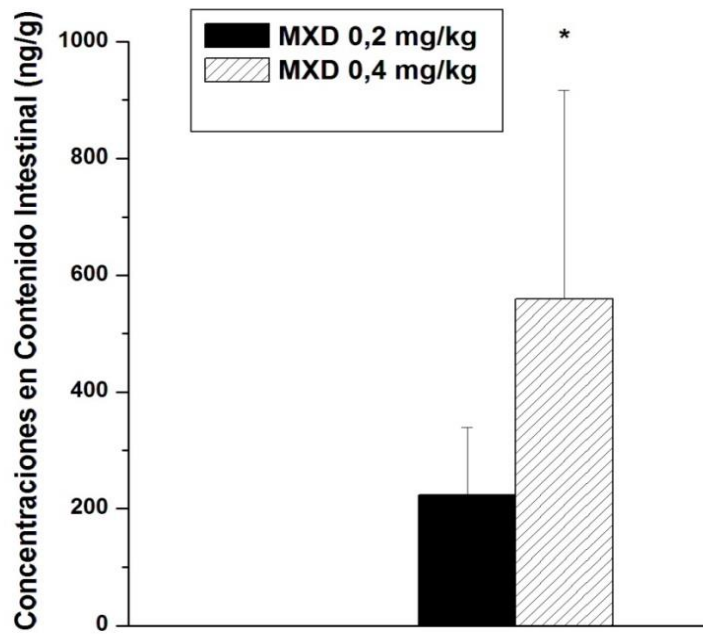


FIGURA 26: Concentraciones de moxidectina (MXD) (\pm DE) obtenidas en contenido intestinal, luego del tratamiento por vía intraruminal (IR) a razón de 0,2 mg/kg (MXD-0,2) y 0,4 mg/kg (MXD-0,4) en ovinos. * diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

Capítulo IV

SECCIÓN EXPERIMENTAL II

Caracterización *in vitro* de la actividad de las LMs contra *H. contortus* resistente.

4.1. Introducción

En los últimos años se avanzó en la estandarización de métodos *in vitro*, para el diagnóstico y caracterización del fenómeno de resistencia en helmintos. Algunos de estos métodos se propusieron como una herramienta útil para el diagnóstico temprano de resistencia (Taylor *et al.* 2002, Coles *et al.* 2006), que permitiría detectar este fenómeno en sus estadios iniciales y eventualmente recomendar medidas de control. Sin embargo, existen importantes dificultades en el desarrollo de estas metodologías y en la interpretación de la información surgida de las mismas. Problemas de sensibilidad, rango de concentraciones, solubilidades de las drogas en los medios, etc., no han permitido correlacionar los datos obtenidos con la información proveniente de los ensayos *in vivo*.

La presente sección experimental plantea validar un método *in vitro* para caracterizar la actividad de las LMs contra nematodos gastrointestinales con la suficiente sensibilidad para diferenciar entre aislamientos susceptibles y resistentes, así como también poder detectar diferencias de acción entre los compuestos bajo estudio pertenecientes a esta familia de drogas. Se puso a punto el TIML para evaluar la actividad *in vitro* de las LMs y también un test para evaluar la acumulación de droga en especímenes adultos. Este tipo de metodologías son necesarias para complementar la información obtenida de los estudios *in vivo* y para poder mejorar la comprensión de la actividad farmacológica de las LMs

4.2. Hipótesis y Objetivos específicos

Se plantearon las siguientes **hipótesis**:

- a. La eficacia *in vivo* de las LMs contra *H. contortus* puede ser caracterizada a través de técnicas *in vitro* usando estadios larvarios.
- b. La entrada de las LMs en especímenes adultos puede ser caracterizada a través de estudios de acumulación *in vitro*.

Los **objetivos específicos** de esta Sección Experimental fueron:

- a. Desarrollar una metodología *in vitro* para caracterizar la actividad de las LMs contra estadios larvarios de *H. contortus*.
- b. Establecer a través de esta metodología la susceptibilidad o resistencia de los aislamientos de *H. contortus* para las LMs.
- c. Desarrollar una metodología *in vitro* para caracterizar la acumulación de las LMs en estadios adultos de *H. contortus*.

4.3 Desarrollo experimental

Los trabajos experimentales de la presente sección se llevaron a cabo en el Laboratorio de Parasitología de la EEA INTA Balcarce y en el laboratorio de Farmacología de la Fac de Cs Veterinarias de la UNCPBA. Se utilizaron aislamientos de una población de referencia de *H. contortus* susceptible (CEDIVE) (Guzmán *et al.* 2017) y el aislamiento de la población de *H. contortus* propio de la Reserva 8 (campo experimental de la EEA INTA Balcarce) que cuenta con un historial de uso repetido de IVM hasta 1997 momento en el que se diagnosticó la resistencia a IVM y BZMs mediante TRCH (Entrocasso, comunicación personal) y que fue confirmada años después (Entrocasso *et al.* 2008; Lifschitz *et al.* 2010a). Los detalles de la metodología utilizada se describen en el capítulo II: Metodología Analítica. A continuación se describe el desarrollo de cada experimento con sus respectivos resultados:

4.3.1 Experimento 1:

Test de inhibición de la migración larval (TIML)

4.3.1.a. Estandarización de la prueba

Para la puesta a punto y estandarización de la prueba se utilizó el fármaco IVM como representante de las LMs y se consideraron cinco pasos críticos en el desarrollo y adaptación de la técnica: 1) la temperatura de incubación de las larvas durante todo el proceso, 2) la disolución de IVM en el medio acuoso, 3) el desenvainamiento de las larvas, 4) el sustrato de migración y 5) el orden de

incorporación de los componentes a la prueba. Para todos los pasos críticos se realizaron 3 pruebas completas con 4 repeticiones cada una.

Se probaron diferentes temperaturas de incubación en un rango comprendido entre los 22 a 28 °C, encontrándose que entre 24 y 26 °C las larvas se mantuvieron vitales y la migración fue completa. Para evaluar la disolución de las LMs en el medio acuoso, se probaron diferentes concentraciones de Tween 80, al 1, 2 y 3 %, sin encontrar beneficios en la utilización de este compuesto. Las soluciones de concentración stock se realizaron con DMSO y las soluciones de concentración de la prueba se diluyeron en agua bidestilada. Por otra parte se evaluó el efecto de desenvainar las larvas. Se probó la utilización de larvas desenvainadas con hipoclorito de sodio al 0,8 % y larvas sin desenvainar. Finalmente, se decidió utilizar las larvas sin desenvainar, ya que se observó que el tratamiento con hipoclorito producía una importante mortandad de las larvas y aumentaba el coeficiente de variación de la prueba. Como sustratos de migración se utilizó agua y agar al 1,5 %. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre las diversas opciones evaluadas, la utilización de agar facilitó la lectura. Finalmente se probó invertir el orden de la incorporación de las larvas y las LMs al sistema, con el fin de mejorar la asociación del fármaco a las larvas, hallándose la importancia de colocar primero las larvas en la placa.

El sistema utilizado para la prueba de inhibición de la migración larval fue confeccionado particularmente para este trabajo de tesis y se muestra en la FIGURA 27.

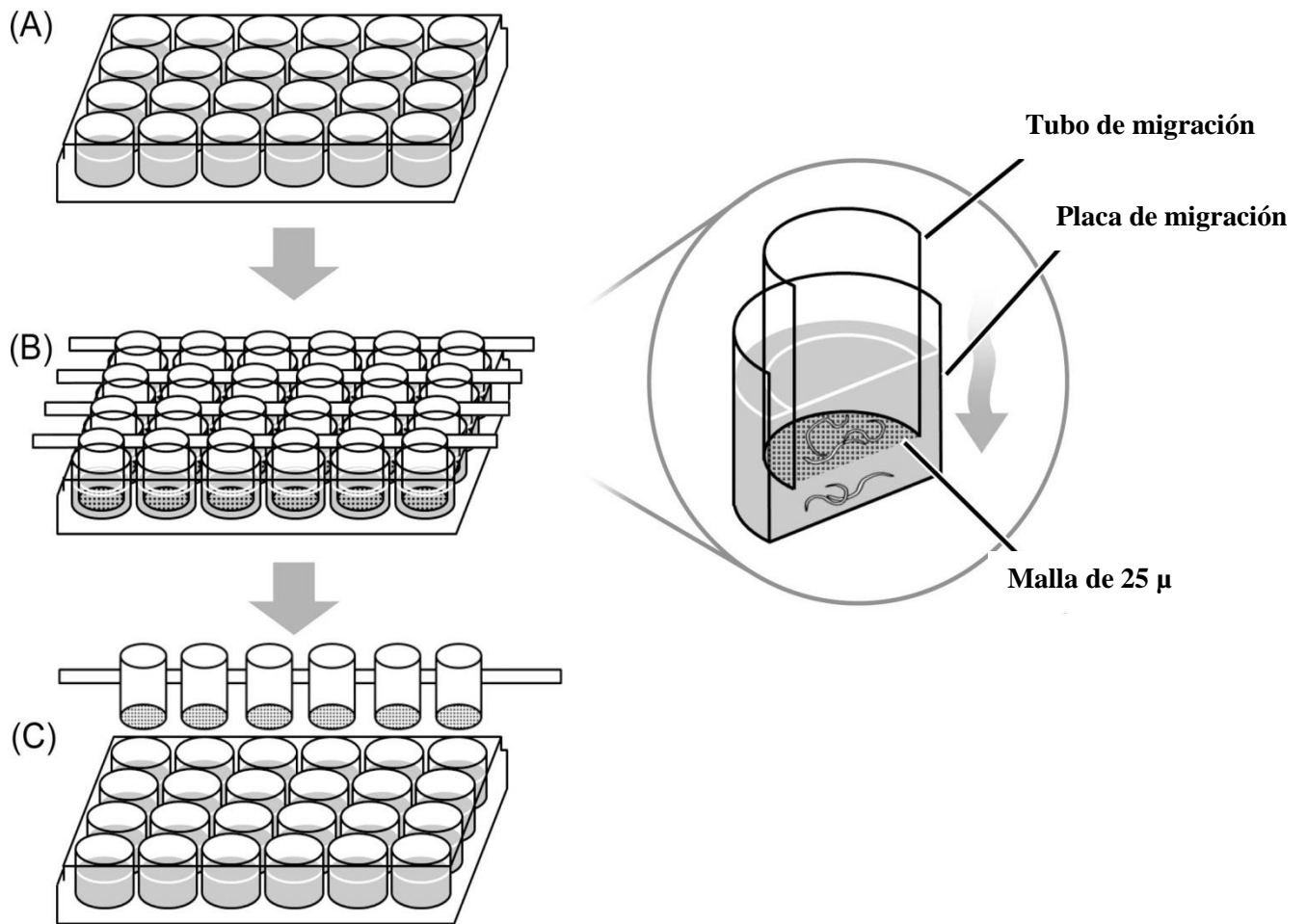


FIGURA 27: Sistema de migración. A: Placa de incubación; B: Placa de migración; C: Placa de lectura. Ampliado: sistema de filtro para migración.

Los resultados obtenidos en la estandarización de las prueba de inhibición de la migración larval se muestran en las FIGURAS 28, 29, 30 y 31.

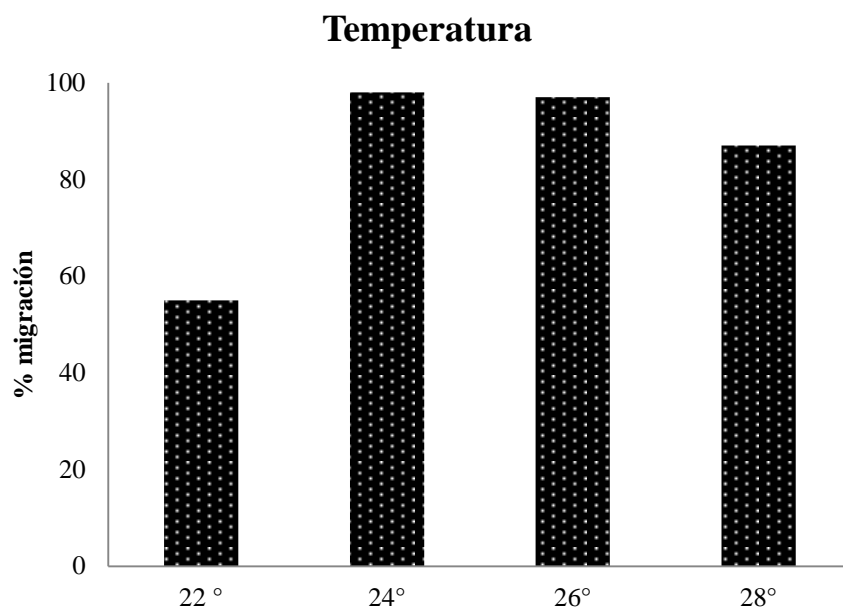


FIGURA 28: Porcentaje promedio de migración larval (n = 96) de los aislamientos de poblaciones de *H. contortus* susceptible y resistente incubados a diferente temperatura.

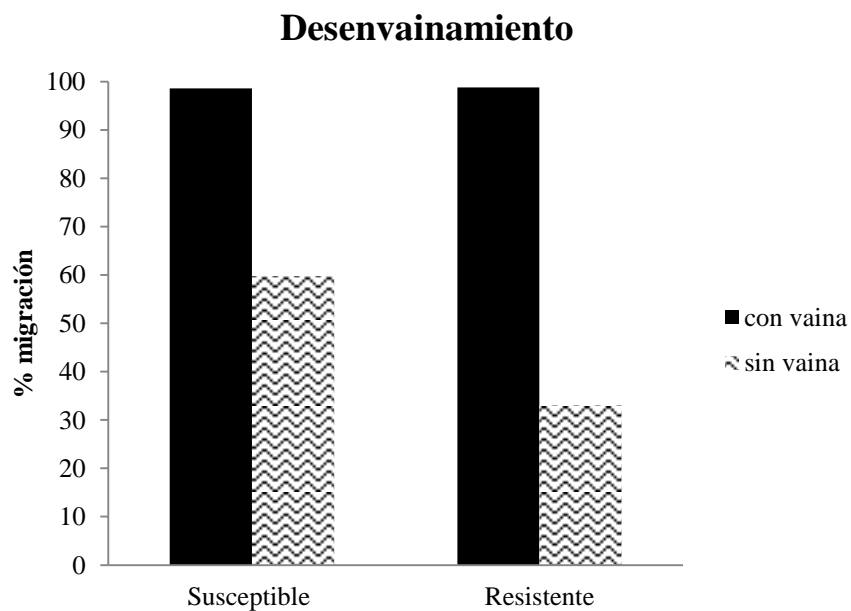


FIGURA 29: Porcentaje promedio de migración larval (n = 48) de los aislamientos de poblaciones de *H. contortus* susceptible y resistente con y sin desenvainamiento

Sustrato agua vs agar

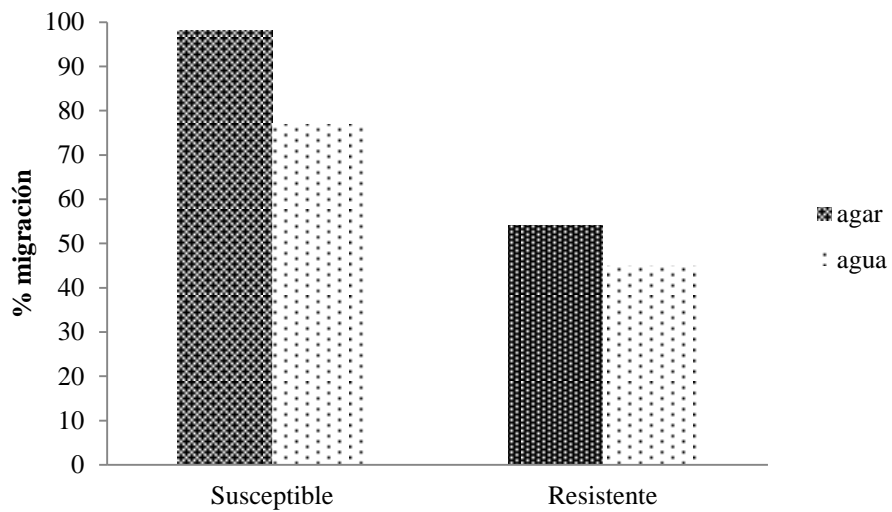


FIGURA 30: Porcentaje promedio de migración larval (n = 48) de los aislamientos de poblaciones de *H. contortus* susceptible y resistente con diferentes sustratos de migración (agua y/o agar).

Orden de incorporación de los componentes

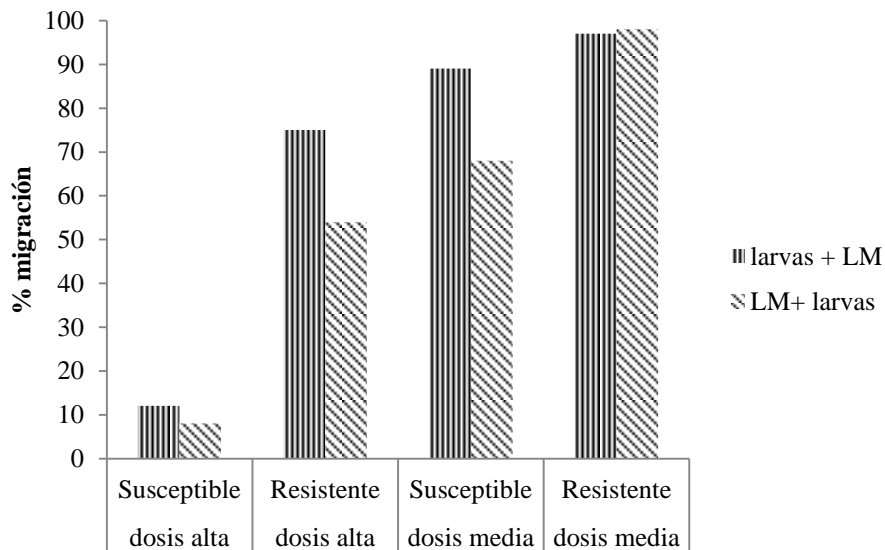


FIGURA 31: Porcentaje promedio de migración larval (n = 96) de los aislamientos de poblaciones de *H. contortus* susceptible y resistente con diferente orden de incorporación de los componentes al sistema.

4.3.1.b. Caracterización in vitro de la actividad de IVM contra aislamientos de poblaciones susceptibles y resistentes de *H. contortus*

Una vez establecidas las mejores condiciones experimentales descritas en el punto anterior, se probó el efecto de la IVM sobre la motilidad larval de aislamientos de poblaciones de *H. contortus* susceptible (CEDIVE) y resistente (R8). Se evaluaron los efectos de la IVM en el rango de concentraciones entre 1×10^{-2} y 5×10^{-9} . Se realizaron 4 repeticiones de la prueba completa, con 6 repeticiones por concentración y por aislamiento. Para cada aislamiento se obtuvo una curva dosis-respuesta con una bondad de ajuste entre 90 y 97 %. Los resultados que se obtuvieron dentro del mismo aislamiento fueron similares. El coeficiente de variación fue menor a 20% y también para cada prueba completa. En las FIGURAS 32 y 33 se muestran las curvas dosis-respuesta de los aislamientos de *H. contortus* susceptible y resistente respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la respuesta a la dosis de IVM entre las poblaciones susceptibles y resistentes. La comparación de las curvas dosis-respuesta se muestran en la FIGURA 34.

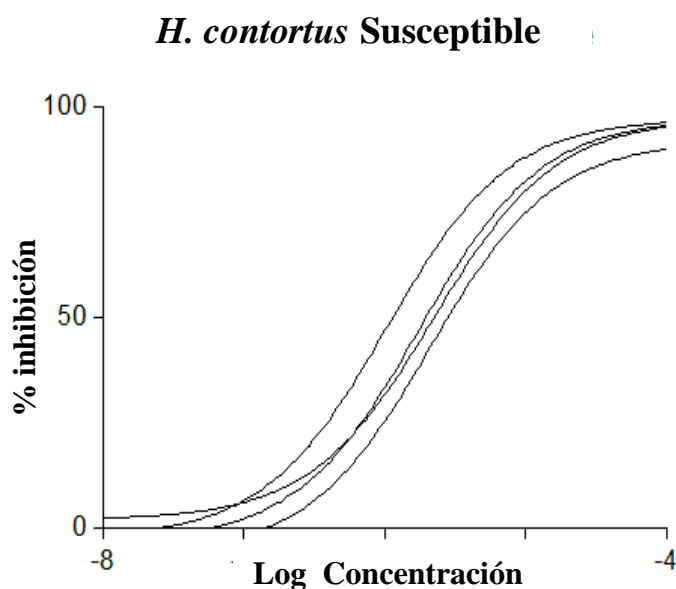


FIGURA 32: Actividad de ivermectina (IVM) expresada como porcentaje de inhibición de la motilidad larval en aislamientos de *H. contortus* proveniente de una población susceptible. Concentraciones expresadas como Log en M.

***H. contortus* Resistente**

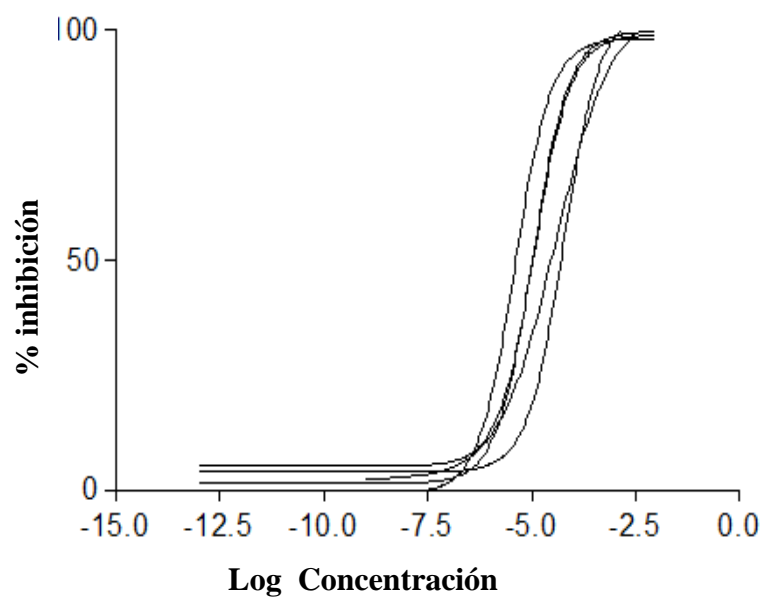


FIGURA 33: Actividad de ivermectina (IVM) expresada como porcentaje de inhibición de la motilidad larval en aislamientos de *H. contortus* proveniente de una población resistente. Concentraciones expresadas como Log en M.

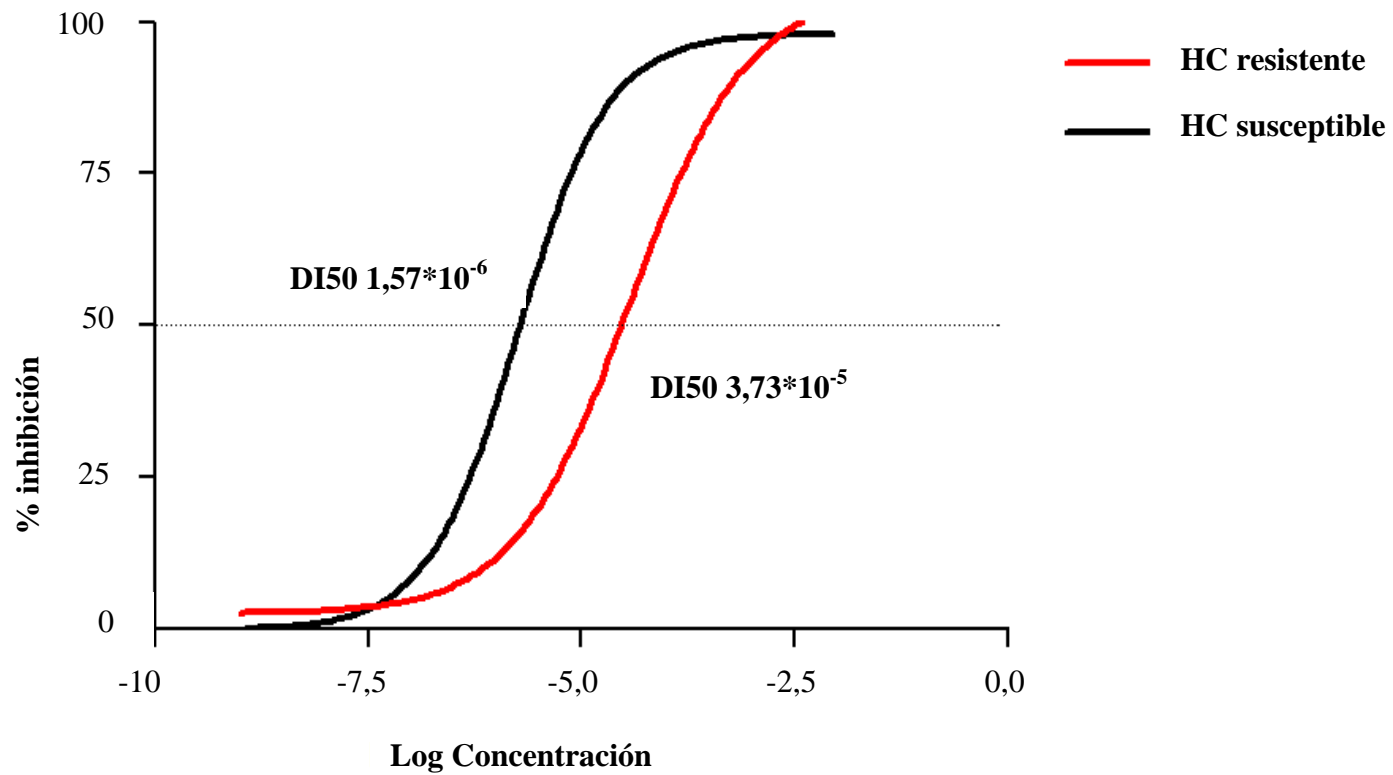


FIGURA 34: Actividad de la IVM expresada como porcentaje de inhibición de la migración larval en aislamientos de *H. contortus* (HC) provenientes de poblaciones susceptibles versus resistentes (concentraciones en M). Cada curva representa el promedio de 4 repeticiones de pruebas completas (n= 24).

Los diferentes parámetros calculados en la prueba de inhibición de migración larval se muestran en la TABLA 42.

TABLA 42: Parámetros obtenidos del análisis de las curvas dosis respuesta obtenidas de las pruebas de inhibición de la migración larval de IVM sobre aislamientos de *H. contortus* proveniente de poblaciones susceptible y resistente:

Aislamiento	DI50	DI90	DI95	DI99	ES	r ²
<i>H. contortus</i> <i>Resistente</i>	3,73*10 ⁻⁵ (32,6µg/ml)	1,17*10 ⁻³ (1023,7 µg/ml)	3,76*10 ⁻³ (3290 µg/ml)	4,99*10 ⁻² (43662,5 µg/ml)	0,13	0,94
<i>H. contortus</i> <i>Susceptible</i>	1,81*10 ⁻⁶ (1,57 µg/ml)	2,61*10 ⁻⁵ (22,84µg/ml)	6,48*10 ⁻⁵ (56,7 µg/ml)	4,82*10 ⁻⁴ (421,75 µg/ml)	0,08	0,95

DI50: Dosis inhibitoria 50. DI90: dosis inhibitoria 90. DI95: dosis inhibitoria 95. DI99: Dosis inhibitoria 99. ES: error estándar. r²: coeficientes de determinación.

El factor de resistencia (FR) calculada como el cociente entre la dosis inhibitoria promedio del aislamiento *H. contortus* resistente sobre *H. Contortus* susceptible fue de 20,6. La comparación de las DI50 de *HC resistente* versus DI50 de *HC susceptible* arrojó una diferencia significativa (p ≤ 0,05).

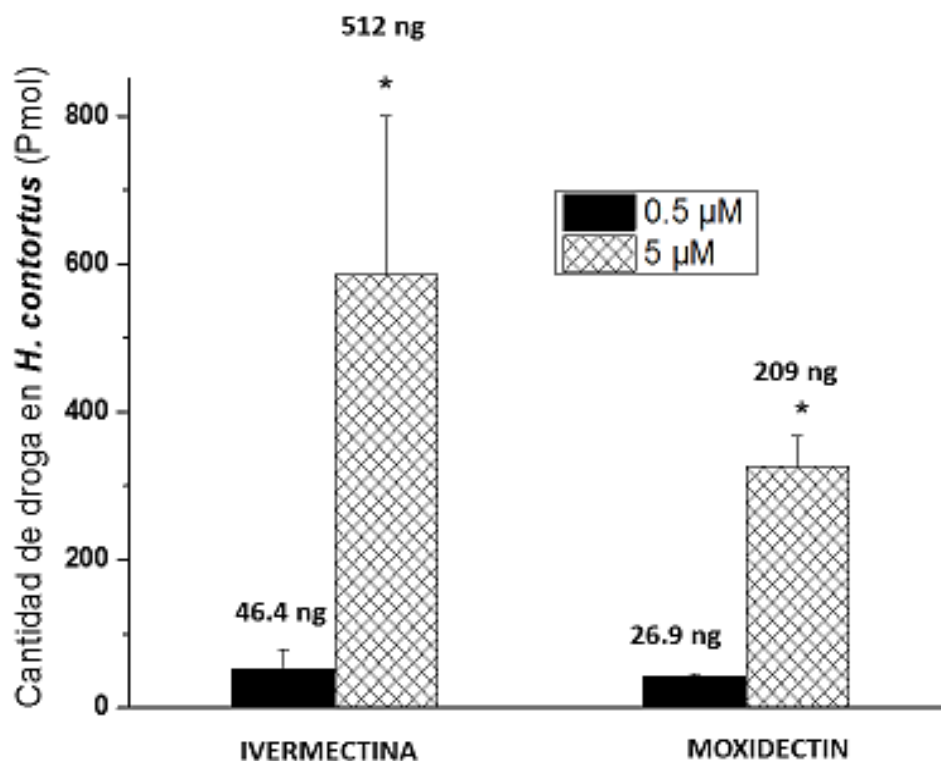
4.3.2. Experimento 2:

Test *in vitro* con especímenes adultos de parásitos:

Medición de la acumulación de IVM – MXD en *H. contortus*

En el presente experimento se evaluó el efecto de la concentración y del tiempo de incubación sobre la acumulación de IVM y MXD como representantes de las LM en especímenes adultos *de H. contortus*. Se estudiaron dos concentraciones (0,5 µM y 5 µM) y dos diferentes tiempos de incubación (15 minutos y 3 horas). La acumulación de IVM y MXD en los especímenes adultos de

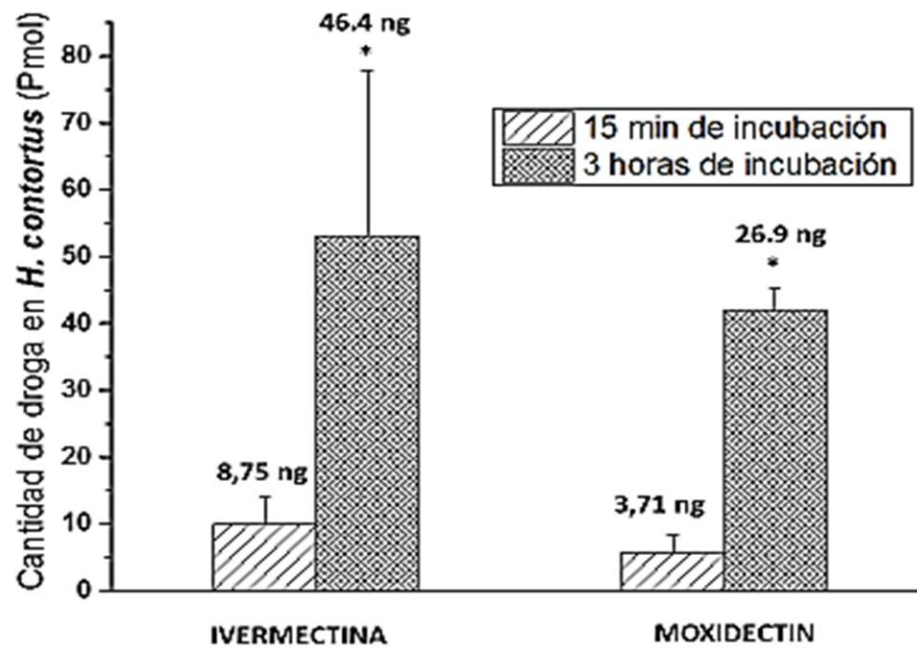
H. contortus, al igual de lo ocurrido en las pruebas *in vivo*, fue directamente proporcional a la concentración del fármaco en el ambiente que rodea al parásito (en este caso el medio de incubación). La acumulación de cada fármaco en los parásitos incubados en concentraciones de IVM y MXD de 5 μM resultó entre 7,7 y 11 veces mayor a la incubación en 0,5 μM ($p \leq 0,05$). Los valores de la acumulación total en *H. contortus* de IVM y MXD luego de la incubación a las concentraciones de 0,5 μM y 5 μM se detalla en la FIGURA 35.



1

FIGURA 35: Acumulación de ivermectina (IVM) y moxidectina (MXD) en especímenes adultos de *H. contortus* luego de su incubación a 0,5 μM y 5 μM . * diferencias significativas $p \leq 0,05$).

La acumulación de IVM y MXD en los parásitos fue también influenciada por el tiempo de exposición a las drogas. Los valores de acumulación en *H. contortus* fueron significativamente menores a los 15 minutos comparados con los obtenidos luego de 3 horas de incubación ($p \leq 0,05$) (FIGURA 36)



2

FIGURA 36: Acumulación de ivermectina (IVM) y moxidectina (MXD) en especímenes adultos de *H. contortus* luego de su incubación durante 15 minutos y 3 horas a 0,5 µM.

Finalmente se comparó la acumulación de IVM y MXD en parásitos vivos y muertos. Los parásitos utilizados muertos fueron colocados a 0 °C durante 1 hora para comprobar su muerte. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de acumulación entre los parásitos vivos y muertos ($p \leq 0,05$).

Capítulo V

SECCIÓN EXPERIMENTAL III

Estudio de expresión de glicoproteína-P2 en *H. contortus* resistente a lactonas macrocíclicas.

5.1. Introducción

Los crecientes reportes de resistencia a los antiparasitarios reflejan un problema que enfrenta la clínica veterinaria así como la medicina humana en diferentes regiones del mundo. El desarrollo de resistencia antihelmíntica es un proceso de evolución donde individuos que sobreviven a un tratamiento con una droga contribuyen con sus genes a la siguiente generación. Luego de muchas generaciones, la frecuencia de esos genes aumentará dentro de la población parasitaria. Existen diferentes mecanismos por los cuales los parásitos podrían sobrevivir al tratamiento con una droga. Una variación en la estructura de una proteína que reduzca la afinidad de la droga por la misma o la disminución de la concentración de la droga en su sitio de acción por intervención de un mecanismo de eflujo, son potenciales mecanismos de resistencia a drogas antihelmínticas (Sangster, 1994, 1999). Para el caso de las LMs, los mecanismos de resistencia no se encuentran del todo dilucidados. Diferentes estudios mostraron que mutaciones en el canal de cloro ligado al glutamato, sitio de acción de estos compuestos, produjeron una alta resistencia a IVM (Dent *et al.* 1997; 2000). Por otra parte, la sobre-expresión de la proteína de transporte Gp-P ha sido también asociada con la resistencia a las LMs (Blackhall *et al.* 1998; Xu *et al.* 1998; Le Jambre *et al.* 1999; Sangster, 1999).

5.2. Hipótesis y Objetivos específicos

En esta sección experimental se plantearon las siguientes **hipótesis**:

- 1) Existe una sobreexpresión de la proteína de transporte glicoproteína-P2 (Gp-P2) en aislamientos de *H. contortus* resistente a LMs.
- 2) La expresión de Gp-P2 en *H. contortus* resistente a LMs se modifica luego del tratamiento con diferentes drogas de esta familia de antiparasitarios.

Los **objetivos específicos** de esta sección fueron:

- a) Validar la metodología para medir la expresión de Gp-P2 en aislamientos de *H. contortus* susceptibles y resistentes a LMs.
- b) Cuantificar el contenido de Gp-P2 en aislamientos susceptibles y resistentes a LMs.
- c) Evaluar la influencia que tiene la administración con diferentes LMs sobre la expresión de transportadores celulares proteicos (Gp-P2) en *H. contortus* resistente recuperados de ovinos tratados.

5.3. Desarrollo experimental

La Sección comprendió dos experimentos que fueron realizados en la Reserva Experimental 8, en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA). Se utilizaron corderos de las majadas de cruzamiento (Romney marsh, Corriedale y Texel) de 7-8 meses de edad que fueron desparasitados con LVM a razón de 1 ml/22 kg de peso vivo previo a su ingreso al potrero experimental. Los animales fueron alojados en el potrero experimental y se registró la carga parasitaria mediante HPG semanalmente hasta alcanzar niveles adecuados para llevar a cabo los experimentos. Adicionalmente, 6 animales previamente desparasitados con LVM fueron mantenidos en corrales con piso de cemento e infestados artificialmente con un aislamiento de una población susceptible de *H. contortus*.

5.3.1. Validación del método de cuantificación relativa de Gp-P2 por PCR en tiempo real.

Las curvas de validación fueron realizadas con cantidades decrecientes de ADN copia en pool diluidas a intervalos de 5 veces para evaluar la eficiencia de la PCR en tiempo real. Se utilizó al gen de Actina como gen de referencia. Las pendientes de las curvas de validación de los juegos de primers utilizados para la cuantificación mediante PCR en tiempo real fueron de $-3,52$ para Gp-P2 y de $-3,66$ para Actina. La eficiencia de las reacciones fue de 92 y 87 % respectivamente. Los valores de los coeficientes de determinación (r^2) fueron de 0,999 para ambos genes en estudio demostrando

que los resultados obtenidos ajustan en forma aceptable. Las curvas de regresión lineal se muestran en las FIGURAS 37 y 38.

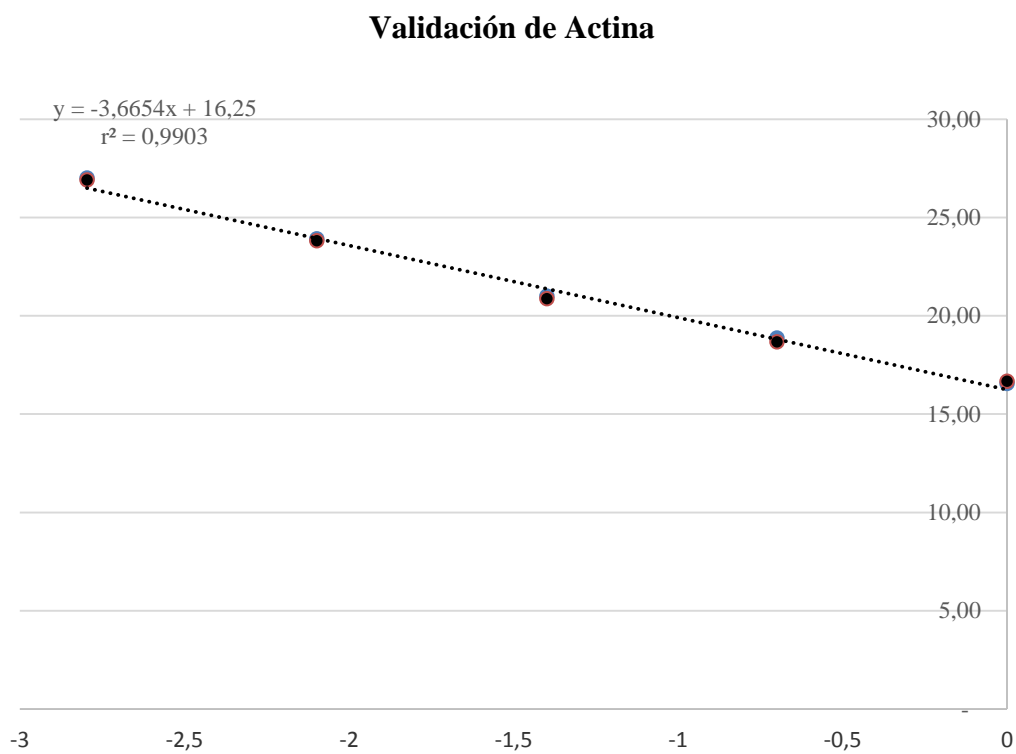


FIGURA 37: Curvas de validación de la expresión de Actina, expresado como Ct en función de la concentración de ADNc (log ng). r^2 = coeficiente de determinación, y= pendiente

Validación de Gp-P2

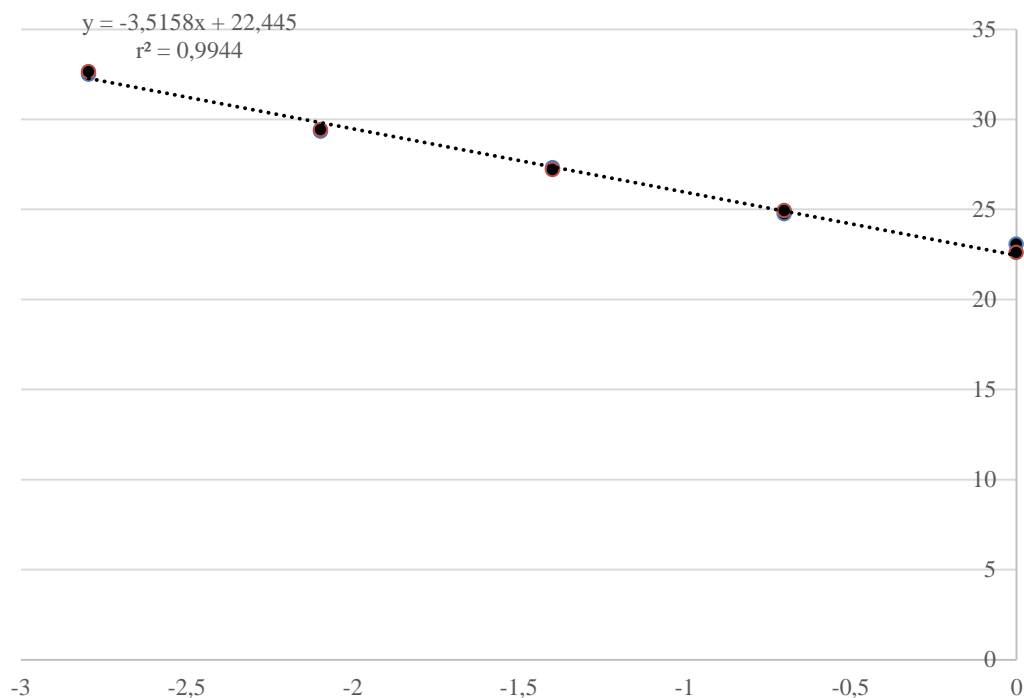


FIGURA 38: Curva de validación de la expresión Glicoproteína P2 (Gp-P2), expresado como Ct en función de la concentración de ADNc (log ng), r^2 = coeficiente de determinación, y= pendiente

5.4. Experimento 1:

Evaluación de la expresión de Gp-P2 en aislamientos resistentes y susceptibles de *H. contortus*

5.4.1. Animales Experimentales.

Se utilizaron 8 corderos que fueron divididos en 2 grupos experimentales:

Grupo CONTROL SUSCEPTIBLE, constituido por 4 animales infestados con un aislamiento susceptible de *H. contortus* y que no recibieron tratamiento antihelmíntico.

Grupo CONTROL RESISTENTE, constituido por 4 animales infestados con un aislamiento resistente de *H. contortus* y que no recibieron tratamiento antihelmíntico.

5.4.2. Toma de muestras

En el experimento se cuantificó la expresión de Gp-P2 en especímenes adultos de *H. contortus* susceptibles y resistentes a LMs. Para ello se realizó la eutanasia de los animales experimentales y se recuperaron los especímenes adultos de *H. contortus*. En la necropsia, del abomaso de cada animal se recuperaron rápidamente 20 hembras adultas que fueron lavadas suavemente con solución salina a 4 °C e inmediatamente colocadas en crio-viales y congeladas en nitrógeno líquido para realizar posteriormente los estudios de expresión a través de la técnica de PCR en tiempo real. La metodología analítica utilizada se describe en detalle en el capítulo 2.

5.4.3. Resultados

5.4.3. a. Cuantificación relativa de Gp-P2 en *H. contortus* resistente y susceptible

La cuantificación relativa mostró que la expresión del gen que codifica la Gp-P2 fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en los especímenes adultos de *H. contortus* resistentes ($1,00 \pm 0,42$) que en susceptibles ($0,32 \pm 0,14$). El valor más alto de expresión de Gp-P2 en *H. contortus* susceptible fue menor al valor más bajo obtenido en los parásitos resistentes. En la FIGURA 39 se muestran los valores de expresión individuales obtenidos en los *H. contortus* recuperados de cada animal experimental.

Expresión de Gp-P2 en aislamientos de *H. contortus* Resistente y Susceptible

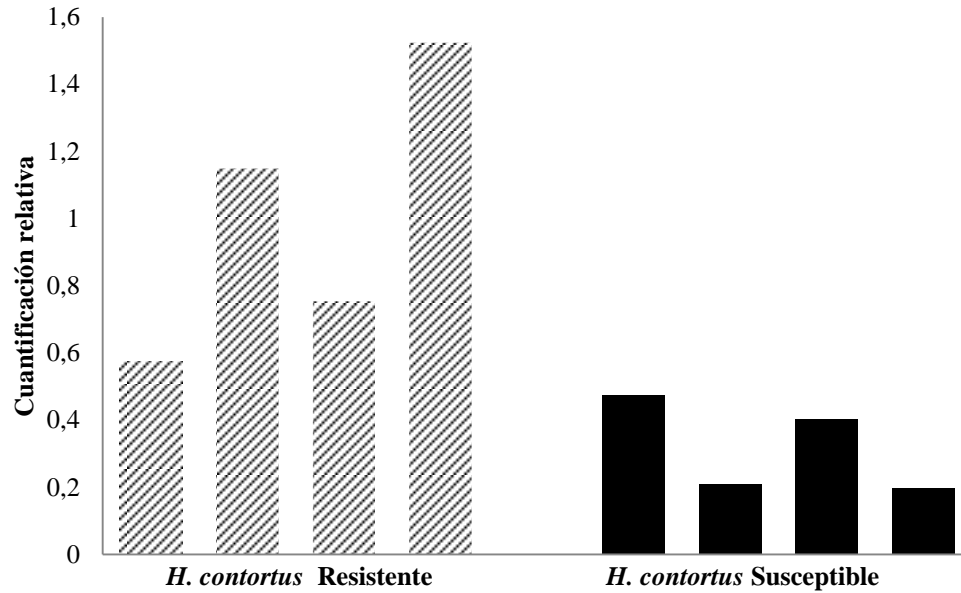


FIGURA 39: Expresión relativa de la Glicoproteína-P2 (Gp-P2) en especímenes adultos de *H. contortus* resistente y susceptible recuperados de corderos sin tratamiento.

5.5. Experimento 2:

Efecto del tratamiento con diferentes LMs sobre la expresión de Gp-P2.

5.5.1. Animales experimentales y tratamiento

Se utilizaron 40 animales naturalmente naturalmente infestados con cepas resistentes a las LMs que fueron divididos en 4 grupos experimentales teniendo en cuenta el peso corporal y el grado de infestación parasitaria evaluado de acuerdo a los resultados del conteo de HPG al inicio del experimento. Se realizaron los siguientes tratamientos:

Grupo CONTROL, constituido por 4 animales, no recibieron tratamiento antihelmíntico.

Grupo MXD, constituido por 12 animales, se trataron con MXD (Cydectin®, Fort Dodge Argentina) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Grupo ABM, constituido por 12 animales, se trataron con ABM (Abamin®, Rosenbusch Argentina) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Grupo IVM, constituido por 12 animales, se trataron con IVM (Ivomec Oral®, Merial Uruguay) por vía IR a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

5.5.2. Toma de muestras

Cuatro animales de cada grupo experimental fueron sacrificados a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento y se recuperaron los especímenes adultos de *H. contortus* resistente tal lo descrito para el Experimento 1. Posteriormente se realizaron los estudios de expresión a través de la técnica de PCR en tiempo real tal como se describe en detalle en el capítulo 2.

5.5.3. Resultados

En el presente experimento se cuantificó la expresión de Gp-P2 en especímenes adultos de *H. contortus* recuperados de ovinos a las 12, 24 y 48 horas post-tratamiento con IVM, ABM y MXD con el fin de establecer el patrón de la expresión relativa post tratamiento de cada LM y se comparó con los especímenes obtenidos de animales sin tratamiento antihelmíntico. El tratamiento con IVM indujo un incremento en la expresión de Gp-P2 en los especímenes adultos de *H. contortus* recuperados, alcanzando valores significativamente mayores a las 12 y 24 horas post-tratamiento. El tratamiento con ABM, a diferencia del anterior, no mostró modificaciones significativas, mientras que en el tratamiento con MXD, si bien los valores de expresión de Gp-P2 no sufrieron cambios significativos, se observó una tendencia a incrementarse a las 12 horas. Los promedios de expresión de Gp-P2 obtenidos para cada fármaco a los diferentes tiempos post-tratamiento se muestran en las FIGURAS 40, 41 y 42.

Expresión de Gp-P2 en *H. contortus* resistente post-tratamiento con IVM

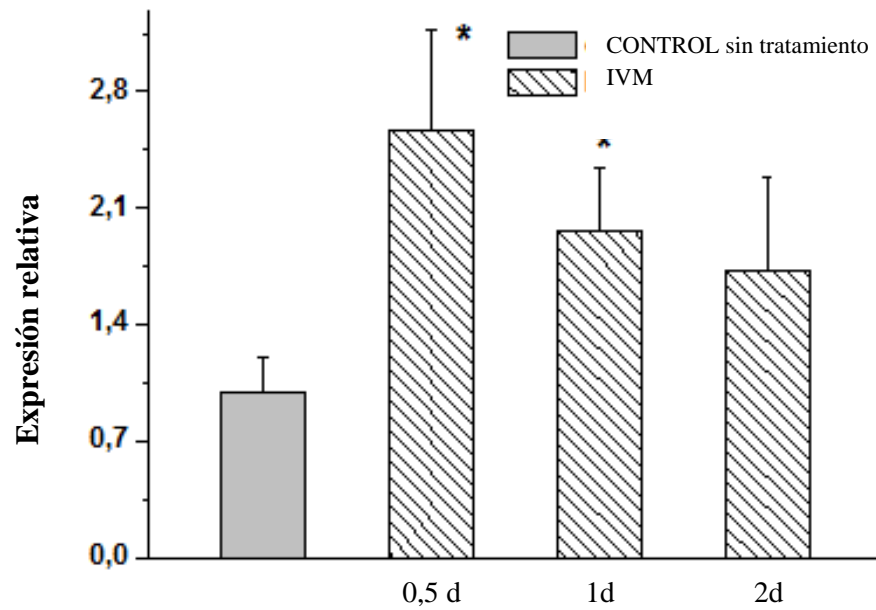


FIGURA 40: Expresión relativa (promedio \pm DE) de la glicoproteína-P2 (Gp-P2) en especímenes adultos de *H. contortus* resistente recuperados de corderos sin tratamiento (CONTROL) y de corderos tratados por vía IR con ivermectina (IVM) (0,2 mg/kg) a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento (*). Se observó diferencia significativa entre los animales tratados con respecto al grupo sin tratar ($p \leq 0,05$).

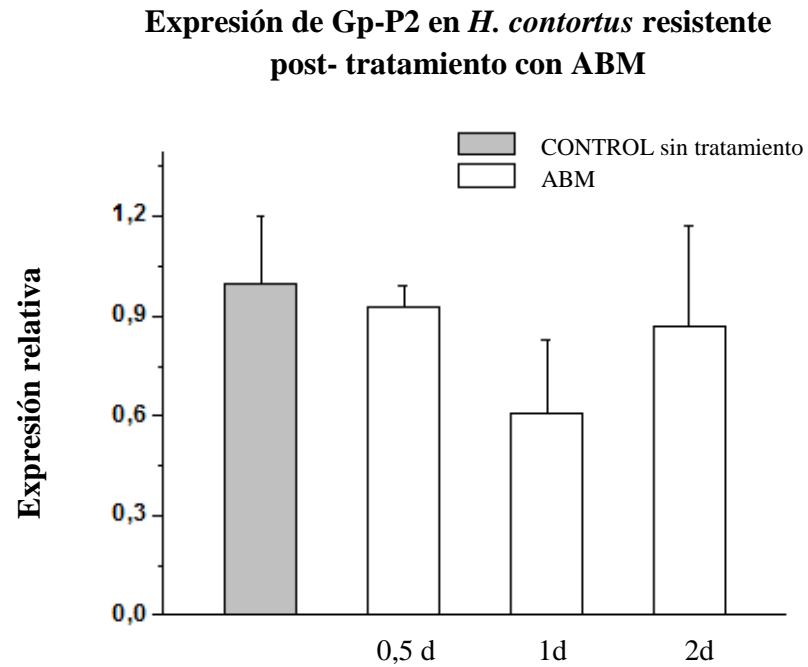


FIGURA 41: Expresión relativa (promedio \pm DE) de la glicoproteína-P2 (Gp-P2) en especímenes adultos de *H. contortus* resistente recuperados de corderos sin tratamiento (CONTROL) y de corderos tratados por vía IR con abamectina (ABM) (0,2 mg/kg) a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento.

**Expresión de Gp-P2 en *H. contortus* resistente
post- tratamiento con MXD**

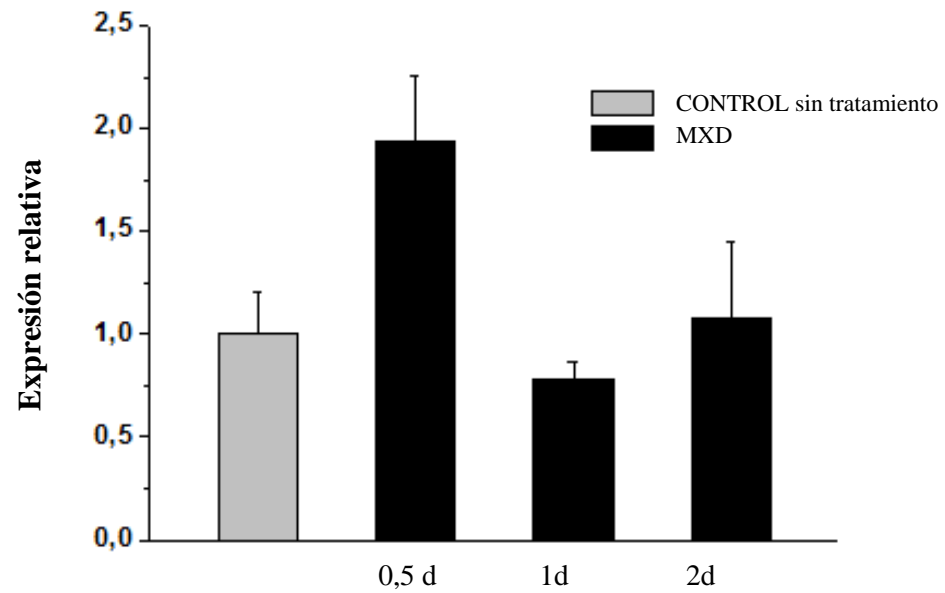


FIGURA 42: Expresión relativa (promedio \pm DE) de la glicoproteína-P2 (Gp-P2) en especímenes adultos de *H. contortus* resistente recuperados de corderos sin tratamiento (CONTROL) y de corderos tratados por vía IR con moxidectina (MXD) (0,2 mg/kg) a los 0,5; 1 y 2 días post-tratamiento.

Capítulo VI

DISCUSION GENERAL

Desde la aparición de las primeras drogas antihelmínticas alrededor de 1940, nuevas moléculas se fueron incorporando al mercado farmacéutico veterinario aproximadamente cada 5 años (McKellar y Benchaoui,1996). Sin embargo, en los últimos años la incorporación de nuevas drogas con mecanismos de acción diferentes a las ya existentes, y además que tengan un amplio espectro de acción antiparasitario ha disminuido considerablemente. Probablemente esto se ha debido a que el proceso de búsqueda y verificación de la eficacia clínica y margen de seguridad de nuevos compuestos requieren una inversión de varios cientos de millones de dólares y puede durar más de 10 años (Hennessy, 1997; Witty, 1999).

Ante el escenario actual en donde la renovación de los compuestos antiparasitarios es esporádica y la aparición de resistencia a diferentes familias de drogas, adquiere gran relevancia el conocimiento profundo de las propiedades farmacológicas de las drogas antiparasitarias disponibles y de todos los factores que pueden modificar su actividad en condiciones prácticas. Este trabajo de tesis estuvo orientado a evaluar desde de la interdisciplina fármaco-parasitología, diferentes estrategias destinadas a aumentar la eficacia de las LMs, existentes en el mercado, contra parásitos gastrointestinales resistentes tomando *H. contortus* como modelo. Por otra parte se evaluaron metodologías *in vitro* que permiten caracterizar el estatus de susceptibilidad de los parásitos y se utilizaron herramientas de biología molecular para poder caracterizar los mecanismos de resistencia presentes en dichos nematodos. A continuación se discuten los principales resultados obtenidos en las diferentes secciones experimentales.

6.1. Caracterización *in vivo* de factores que afectan la relación farmacocinética-farmacodinámica de las LMs.

6.1.1. Efecto de la vía de administración:

Las LMs se pueden administrar por diferentes vías que fueron extensamente probadas. Las formulaciones disponibles para ovinos son soluciones inyectables para ser aplicadas por vía subcutánea y soluciones para ser administradas vía oral. Las mismas presentan algunas diferencias

que comprenden desde su utilización en la práctica clínica así como también de su espectro antiparasitario (McKellar y Benchaoui, 1996). En nuestras condiciones de explotación, la formulación subcutánea de IVM fue la más utilizada, por su practicidad, su espectro contra endo y ectoparásitos y su elevada eficacia inicial, además de ser la única formulación disponible en el mercado. Sin embargo, con la aparición de resistencia por parte de diferentes géneros parasitarios, las condiciones óptimas de vías de utilización deben ser reevaluadas.

En Argentina, desde 1988 se han reportado casos en ovinos de resistencia a drogas antihelmínticas. (Entrocasso, 1988; Romero *et al.* 1992; Eddi *et al.* 1996; Caracostantogolo *et al.* 2005), con eficacias variables según el establecimiento analizado. En el presente trabajo la eficacia según el TRCH fue de 45 % para el grupo administrado por la vía usual (SC). Este valor es claramente muy bajo, sin embargo concuerda con trabajos de diagnóstico de resistencia antihelmíntica realizados en el sudeste de la Provincia de Buenos Aires, donde se obtuvieron valores de eficacia entre 28,8 % y 99,9 %. También es coincidente que el principal género involucrado en la resistencia antihelmíntica fuera *H. contortus* en la mayoría de los establecimientos evaluados (Entrocasso, 2006). En la Reserva Experimental 8 del INTA Balcarce, la eficacia clínica entre los años 2006 y 2007 se mantuvo cerca del 75 %, valor mayor al obtenido en este estudio. Sin embargo fue marcadamente mayor que en los TRCH que fueron realizados en años anteriores 1997 (0 %) y 2003 (6 %) (Entrocasso, 2006).

En los primeros años de su aparición en el mercado veterinario la eficacia de IVM frente diferentes géneros de nematodos gastrointestinales fue muy elevada, independientemente de la vía de administración utilizada. La eficacia original de IVM administrada por vía oral contra nematodos susceptibles fue similar contra los parásitos abomasales y levemente superior contra los nematodos intestinales comparado a la administración por vía SC (Borgsteede, 1993). No obstante, algunos estudios con drogas pertenecientes a las LMs plantean algún cambio cuando la susceptibilidad de las cepas parasitarias presentes disminuye. Dichos ensayos evaluaron el efecto de diferentes LMs sobre ovinos infestados experimentalmente con cepas de conocida resistencia a IVM del parásito intestinal *T. colubriformis*. Una mayor reducción de huevos en materia fecal y del número de parásitos en intestino se obtuvo tras el tratamiento con ABM por vía oral (97-98 %) comparada a la administración por vía SC (74-76 %) (Alka *et al.* 2004). Resultados similares fueron conseguidos en otro experimento con MXD. La reducción de huevos en materia fecal y eficacia contra el mismo

parásito intestinal pasaron de un rango de 0-4 % (vía SC) a 98-100 % (vía oral) (Gopal *et al.* 2001) lo que marca la importancia de la vía de administración en la eficacia cuando estamos en presencia de cepas resistentes. Estos antecedentes han llevado a la búsqueda del fundamento farmacológico que explique estas diferencias de eficacia para la misma droga administrada por diferente vía de administración contra cepas de parásitos resistentes. En este contexto, este trabajo de tesis estudió el efecto que tiene la vía de administración tomando a IVM como molécula representante de la familia de las LMs, en el tratamiento de ovinos infestados con parásitos abomasales e intestinales resistentes.

Los recuentos de HPG brindan una idea orientativa de la carga parasitaria animal, pero están muy influenciados por el potencial reproductivo de los géneros presentes en el tracto gastrointestinal. El TRCH descrito por Coles *et al.* (1992), es el test considerado de referencia para evaluar la eficacia de una droga antihelmíntica. Se considera que una droga es eficaz cuando supera el 95 % en los rumiantes menores y tiene en cuenta los valores del conteo de HPG obtenidos a los 14 días posteriores al tratamiento con respecto a un grupo control sin tratamiento. Para el cálculo de la TRCH se utilizó la media aritmética teniendo en cuenta que es directamente proporcional a la cantidad total de huevos expulsados por los animales bajo estudio y además provee un valor más realista de la eficacia antihelmíntica que la media geométrica (McKenna, 1990).

La evolución del recuento de HPG fue diferente para los 3 grupos. Si bien finalizado el período de ensayo no se encontraron diferencias significativas entre las dos vías de administración utilizadas y el TRCH fue semejante para los dos grupos, el grupo IVM-SC manifestó una reducción en la cuenta del HPG y por lo tanto en la eficacia un 40 % menor que el grupo IVM-IR al día 3 post-tratamiento. Estas diferencias se mantuvieron al día 9 post-tratamiento, pero prácticamente no se observaron al día 14 post-tratamiento. El marcado aumento de la eficacia (78 %) al día 3 en el grupo tratado por vía IR podría deberse a los efectos de la IVM sobre la oviposición de los parásitos adultos presentes. Bottjer y Bone (1985), describen una inhibición en la oviposición de los nematodos tanto *in vivo* como *in vitro* como consecuencia del efecto de IVM.

El conteo de parásitos adultos a los 14 días post-tratamiento, llamado test de eficacia controlada (TEC) y descrito por Wood *et al.* (1995), refleja objetivamente la composición genérica y la carga parasitaria total del animal en los diferentes sectores del tracto digestivo. Los valores de las medias geométricas variaron considerablemente a los 14 días post-tratamiento para la cuenta total de

parásitos, sin discriminar por género parasitario, es notable el aumento de la eficacia (95 %) cuando la droga fue administrada por vía IR, alcanzando valores aceptables de eficacia recomendados por la Word Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (Wood *et al.*, 1995), mientras que por vía SC la eficacia obtenida con la media geométrica fue baja (70 %) y más aun con la media aritmética (56 %). Estos valores son coincidentes con los reportados por Borgsteede (1993), que trabajando con aislamientos de poblaciones susceptibles de nematodos obtuvo eficacias de 92 % y 100 % contra *T. vitrinus* y 85,7 y 98 % contra *Cooperia spp* en ovinos tratados con IVM por vía SC y oral. De la misma manera, Gopal *et al.* (2001) con MXD y Alka *et al.* (2004) con ABM, mostraron un considerable aumento de la eficacia en el tratamiento oral comparado con el SC en aislamientos de poblaciones de *T. colubriformis* resistentes a IVM. En bovinos recientemente, encontraron resultados semejantes con MXD donde la eficacia contra *C. oncophora* fue significativamente mayor luego de la administración oral (Leathwick *et al.* 2013) y Cantón *et al.* (2015) reportaron que la eficacia clínica frente a nematodos resistentes a IVM en bovinos fue significativamente mayor luego del tratamiento con IVM por vía oral (74%) comparado con el tratamiento por vía SC (54 %). El mismo concepto fue utilizado en equinos, donde al pasar de la utilización de la vía SC a la oral la reducción de huevos de nematodos en materia fecal aumentó de 36-64 % a 100 % (Saumell *et al.*, 2017).

Considerando la eficacia solamente del abomaso, en el presente estudio se encontraron diferencias significativas entre el grupo CONTROL y el grupo IVM-IR, pero en este caso, si bien la eficacia aumentó de 52 % en el grupo IVM-SC a 82 % en el grupo IVM-IR, calculado con la media geométrica y de 46 a 80 % respectivamente, calculado con la media aritmética, las diferencias entre los grupos tratados no llegaron a ser significativas, ni alcanzaron a los valores determinados por la WAAVP (Wood *et al.* 1995). Al analizar las eficacias por género parasitario presentes en el abomaso, se halló que para *T. axei* y *Teladorsagia spp* hubo diferencias significativas entre los 3 grupos y la eficacia aumentó para ambos géneros pasando de valores aceptables a valores de alta eficacia.

Para *H. contortus* en cambio, no hubo diferencias significativas entre los 3 grupos, pero a pesar de ello la eficacia se logró aumentar de 0 % en el grupo IVM-SC a un 40 % calculada con la media geométrica y a 33 % calculada con la media aritmética, en el grupo IVM-IR. Si bien la eficacia

obtenida es baja, este aumento de la eficacia podría utilizarse como estrategia en algunos casos de resistencia antihelmíntica.

En el conteo de parásitos adultos totales de intestino si bien se hallaron diferencias significativas entre los 3 grupos, las eficacias obtenidas siempre se mantuvieron sobre los valores aceptables recomendados. Al discriminar por género parasitario y por sector, en el intestino delgado tanto *Nematodirus* spp, como *T. colubriformis*, tuvieron diferencias significativas entre los 3 grupos. Sin embargo, mientras que para *Nematodirus* spp. y *T. colubriformis* las eficacias fueron mayores a 95 % en los dos grupos tratados, la eficacia fue inferior a la aceptada en el grupo IVM-SC cuando fue calculada con la media aritmética. Para *Cooperia* spp, no hubo diferencias significativas entre los grupos tratados, pero sí entre cada uno de estos y el grupo CONTROL. En ambos tratamientos las eficacias tuvieron porcentajes aceptables.

En el intestino grueso, tanto para *Oesophagostomum* spp, *Chabertia* spp y *Trichuris* spp, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados pero sí entre cada uno de ellos y el grupo CONTROL. Las eficacias superaron los valores recomendados por la WAAVP en todos los casos.

El conteo de parásitos adultos efectuado en los corderos que se sometieron a eutanasia el día 3 post-tratamiento, si bien no pudo ser analizado estadísticamente por tener un grupo con un número de animales (n= 3) menor al recomendado, la tendencia marcó una diferencia en las medias geométricas de ambos tratamientos, coincidente con lo que se observó en los recuentos del día 14 post-tratamiento. En el abomaso, las tendencias también fueron semejantes al recuento del día 14 post-tratamiento y en intestino grueso no se encontraron parásitos adultos salvo *Nematodirus* spp. en el grupo IVM-SC.

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en la eficacia de las LMs cuando se administraron por distintas vías de administración, es necesario encontrar las bases farmacológicas que las expliquen. Existe una directa relación entre comportamiento farmacocinético y eficacia de los fármacos antiparasitarios (Lanusse y Prichard, 1993). Es por ello que en el presente trabajo caracterizó en forma estandarizada la cinética plasmática y las concentraciones en los sitios de localización parasitaria de IVM tras su administración por ambas vías. Además se evaluó por primera vez bajo condiciones *in vivo* las concentraciones de IVM en un nematodo abomasal (*H. contortus*). La

relación entre la cinética plasmática y las concentraciones en los sitios blanco fue extensamente caracterizada para las diferentes drogas de esta familia tras su administración SC en bovinos (Lifschitz *et al.* 1999; 2000^a y b). En estos trabajos se observó que el plasma reflejaba las concentraciones encontradas en los diferentes sitios de localización parasitaria. Sin embargo, este concepto debe revisarse cuando la vía de administración cambia. Las concentraciones plasmáticas de IVM luego del tratamiento IR fueron menores a las alcanzadas luego de la administración SC (FIGURA 5), tal como se observó en reportes anteriores (Alka *et al.* 2004, Gopal *et al.* 2001). Esto determinó que la exposición sistémica medida como ABC fuese significativamente menor tras la administración IR. La menor concentración plasmática de IVM en el plasma ovino luego de administración oral/IR estaría dada por la adsorción de la droga al material particulado de la ingesta y a la acción de la proteína de eflujo glicoproteína-P (Lifschitz *et al.* 2005; Ballent *et al.* 2007). La menor disponibilidad plasmática de IVM administrada por vía IR afecta su eficacia sobre parásitos externos, por lo cual no se recomienda esta vía de administración para el tratamiento de sarna (Benz *et al.* 1989, McKellar y Benchaoui, 1996). A su vez, luego de la administración SC de IVM en ovinos, la persistencia de la acción antiparasitaria sobre nematodos gastrointestinales resultó más prolongada comparada a la obtenida tras el tratamiento por vía oral (Borgsteede, 1993) lo que está basado en la mayor vida media de eliminación y en el mayor tiempo medio de residencia comparado a la administración oral. Para poder explicar mejor la mayor eficacia de la vía oral contra poblaciones resistentes de parásitos, cuando las concentraciones plasmáticas obtenidas fueron menores, fue necesario estudiar las concentraciones obtenidas en el tracto gastrointestinal y en los parásitos.

Las concentraciones de droga en tracto gastrointestinal tendieron a ser mayores luego de la administración IR que de la inyección SC. Esto se vio particularmente aumentado en el contenido gastrointestinal (abomasal e intestinal). Las concentraciones de droga en el fluido abomasal fueron significativamente mayores tras la administración IR (56 veces), mientras que en el contenido intestinal las diferencias fueron menores principalmente por el aporte del fármaco a través de la secreción biliar e intestinal luego de la administración SC. Otro parámetro de interés para analizar es la relación entre las concentraciones obtenidas en el contenido gastrointestinal y en las mucosas. Mientras que tras la administración SC esta relación es menor a 1 en abomaso y levemente mayor a 1 en intestino, luego de la administración IR los valores se invierten corroborando las elevadas concentraciones del fármaco en el contenido gastrointestinal.

Para tratar de comprender la acción de este tipo de fármacos, se realizó por primera vez la cuantificación de IVM en un nematodo abomasal obtenido de ovinos tratados por las diferentes vías de administración. La concentración de IVM en *H. contortus* provenientes de ovinos tratados por vía IR fue de 14,4 veces mayor que la observada en los parásitos de los animales tratados por vía SC. Existió una importante correlación entre las concentraciones encontradas en el contenido abomasal y en *H. contortus* (FIGURA 8). De esta manera, las mayores concentraciones en el contenido abomasal obtenidas tras la administración IR determinarían mayores concentraciones en los nematodos *H. contortus*. Estas diferencias no serían determinantes cuando los parásitos son susceptibles, sin embargo, cuando el fármaco se enfrenta a parásitos resistentes, estas diferencias cobran importancia ya que le permiten obtener una mayor eficacia cuando el fármaco se administra por una vía oral. Esto podría ser similar en los parásitos ubicados en intestino y explicaría los resultados de la mayor eficacia obtenida contra *T. colubriformis* y *Cooperia spp.* resistente tras la administración oral de ABM y MXD reportados anteriormente (Alka *et al.* 2004 Gopal, *et al.* 2001, Leathwick *et al.* 2013).

El efecto de un antihelmíntico depende de su capacidad de alcanzar los receptores específicos en el parásito blanco. Por lo tanto la capacidad de un fármaco de entrar y acumularse alcanzando concentraciones terapéuticas en el parásito blanco está determinada por sus características físico-químicas como la lipofilicidad y el gradiente de concentración (Álvarez, *et al.* 2007). Estudios *in vivo* proponen que la difusión transcuticular es la principal vía de entrada de IVM en diferentes nematodos y la lipofilicidad de la droga es el mayor determinante de la tasa de transferencia a través de la cutícula del nematodo (Smith y Campbell, 1996; Cross *et al.* 1998). Los fármacos lipofílicos como la IVM, pueden alcanzar al parásito “blanco” desde el contenido intestinal (vía transcuticular) o desde el plasma (ingestión oral) si el nematodo, como el caso de *H. contortus*, es hematófago. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan a la comprensión de los mecanismos de llegada de este tipo de fármacos a los nematodos. La importancia de la entrada transcuticular se evidencia mediante la cuantificación de las concentraciones alcanzadas en *H. contortus* y la relación de dichas concentraciones con las encontradas en el medio que los circundan como es el contenido abomasal. Los parásitos provenientes de animales tratados por vía IR alcanzaron concentraciones significativamente mayores de IVM, que podría estar relacionado a un mayor gradiente desde el contenido abomasal comparado a los nematodos provenientes del tratamiento SC. En estos, en cambio, la contribución del fármaco que llega por el torrente sanguíneo a las concentraciones finales

en el parásito podría ser relativamente mayor teniendo en cuenta las bajas concentraciones de fármaco en el contenido abomasal. Es importante tener en cuenta que la secreción activa de IVM, al igual que otras LMs, desde la sangre a la luz abomasal tiene escasa relevancia (Hennessy *et al.* 2000; Bogan and McKellar, 1988) contrariamente a lo observado en el intestino delgado.

Las mayores concentraciones de IVM en el nematodo *H. contortus* luego de la administración IR pueden explicar el menor número de especímenes adultos de *H. contortus* recuperados después del tratamiento por esta vía. En forma similar, se observaron mayores concentraciones en el contenido del intestino delgado luego del tratamiento IR, no obstante, la magnitud de las diferencias en las concentraciones de fármaco entre las dos vías de administración fue menor a la descrita en abomaso. La excreción biliar de las LMs en rumiantes (Bogan and McKellar, 1988; Hennessy *et al.* 2000; Lifschitz *et al.* 2000a) y la secreción intestinal mediada por la Gp-P (Laffont *et al.* 2002; Ballent *et al.*, 2006, 2007) determinan que cantidades importantes de IVM alcancen el contenido intestinal luego de la administración SC. A pesar de ello, la mayor concentración de IVM medida en el contenido intestinal durante los 2 a 3 primeros días luego de la administración IR puede ser decisiva para la eficacia contra parásitos resistentes localizados en el intestino, como por ejemplo *T. colubriformis* y *C. oncophora* (Leathwick *et al.* 2013).

Las concentraciones de fármaco requeridas *in vivo* para inhibir el desarrollo y/o la implantación larval aún no han sido determinadas. Este dato sería de gran relevancia para poder diagramar racionalmente los tratamientos contra diferentes nematodos gastrointestinales, no se ha podido obtener con exactitud dado la complejidad del cultivo de nematodos *in vitro*. En este contexto, los ensayos *in vivo* son necesarios para complementar la información disponible que proviene de trabajos llevados a cabo bajo condiciones experimentales *in vitro/ex vivo*. Las concentraciones de IVM alcanzadas en la circulación sistémica y en los tejidos del tracto gastrointestinal luego de la administración SC o IR determinan una eficacia equivalente contra nematodos gastrointestinales susceptibles. Sin embargo, las altas concentraciones de fármaco detectados en el tracto gastrointestinal durante los primeros 2-3 días luego de la administración IR pueden tener un efecto relevante cuando se trata de nematodos resistentes. El incremento de la exposición al fármaco puede ser una estrategia para matar parásitos resistentes heterocigotos presentes en estadios tempranos del desarrollo de resistencia (FIGURA 43).

Es importante que exista una buena disponibilidad en el mercado farmacéutico veterinario de formulaciones para poder ser administradas por diferentes vías de administración de acuerdo a la mejor conveniencia. La selección de la vía de administración adecuada para cada situación particular puede optimizar la eficacia de las drogas de uso habitual, como IVM, pero también debe ser tomada en cuenta para los compuestos antiparasitarios recientemente introducidos en el mercado farmacéutico veterinario.

Influencia de la vía de administración en la exposición y eficacia de IVM contra nematodos resistentes

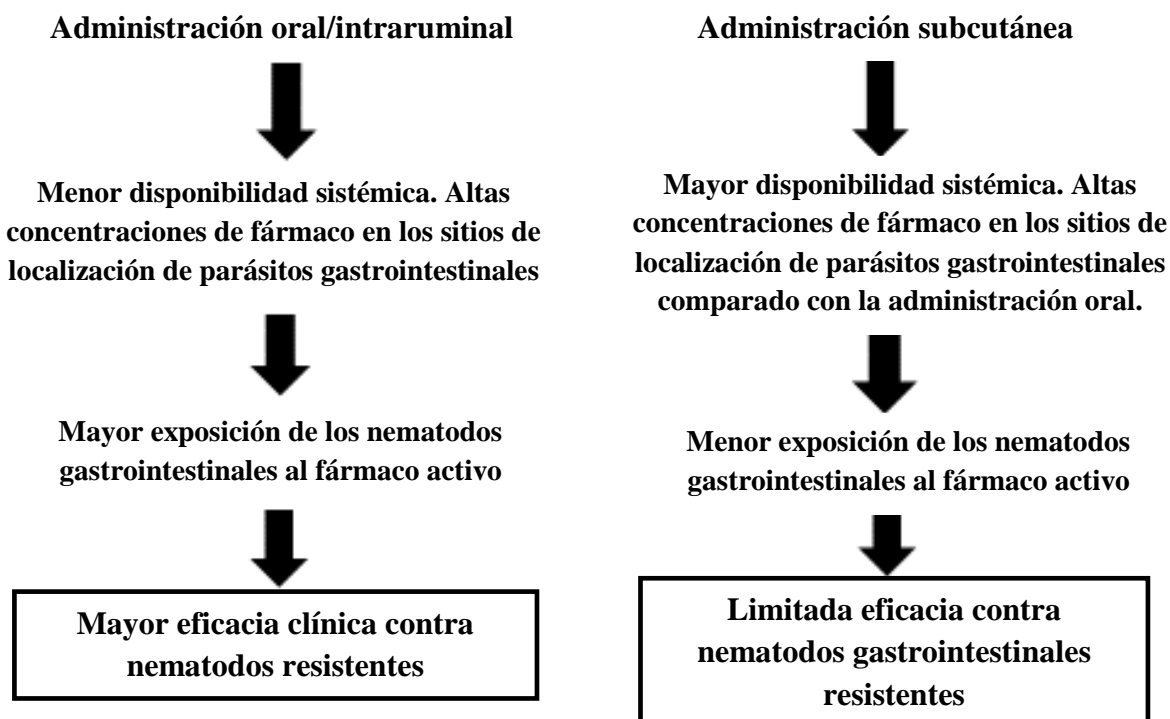


FIGURA 43: Influencia de la vía de administración de IVM en el tratamiento de nematodos gastrointestinales resistentes en rumiantes.

6.1.2. Evaluación fármaco-parasitológica *in vivo* de la actividad antihelmíntica diferencial de las LMs.

Las AVM y MBM pertenecen al grupo de las LMs y comparten propiedades fisicoquímicas comunes como así también ejercen su efecto antiparasitario a través del mismo mecanismo de acción. Sin embargo existen reportes que muestran diferente eficacia entre estos compuestos, especialmente cuando son enfrentados a nematodos resistentes. Estas diferencias pueden deberse a factores de índole farmacocinético, farmacodinámico o a una combinación de ambos. Este trabajo de tesis evaluó en forma comparativa la relación entre las concentraciones plasmáticas, las obtenidas en los sitios de localización parasitaria, en los parásitos y la eficacia clínica de ABM, IVM y MXD bajo condiciones experimentales estandarizadas.

El presente estudio fue realizado en la Reserva Experimental 8, cuyo refugio parasitario presenta antecedentes de elevada resistencia a los antihelmínticos. La evolución de los valores de HPG fueron semejantes para los animales tratados con IVM, ABM y el grupo CONTROL lo que evidencia la falta de eficacia clínica de estos fármacos. En cambio, los animales tratados con MXD mostraron diferencias significativas en los valores de HPG con respecto a los otros grupos. Estos resultados se reflejan en el TRCH, en donde la eficacia clínica de MXD arrojó un valor del 88,8 % mientras que en los corderos tratados con IVM y ABM el valor fue de 0 %. Si bien el valor de eficacia clínica de MXD, fue significativamente superior, no alcanzó al 95 % estipulado por la WAAVP para considerarlo como un fármaco eficaz. En los coprocultivos de todos los tratamientos el género sobreviviente fue *H. contortus*, mientras que en el grupo que no recibió tratamiento *H. contortus* representó aproximadamente la mitad de los géneros intervinientes. Estos resultados son coincidentes a los descriptos en estudios anteriores en Argentina. (Romero y Boero, 2001; Romero *et al.* 2013; Anziani y Fiel, 2015).

Los resultados del TEC de la misma manera, marcaron una diferencia significativa entre los animales tratados con MXD y los animales CONTROL mientras que no existió diferencia entre los otros grupos. En este test, que refleja en forma directa la cantidad de nematodos presentes en el TGI, la eficacia fue significativamente mayor. El principal responsable de la falla en la eficacia de estos fármacos fue *H. contortus*, que mostró en el TEC un 89,5 % de eficacia para MXD; 39,7 % para ABM y 20,1 % para IVM, resultando los promedios de los conteos de especímenes adultos con

diferencias significativas entre los corderos tratados con MXD y el resto de los grupos. Estos resultados son coincidentes a los referidos en estudios similares en ovinos por Craig *et al.* (1992) y Le Jambre *et al.* (1995). De la misma manera, Wooster *et al.* (2001) obtuvo una eficacia de MXD mayor a 95% mientras que la de IVM y ABM fue menor a 80 % en diferentes aislamientos parasitarios de bovinos. Gopal *et al.* (2001) trabajando con aislamientos de *T. colubriformis* en cabras obtuvieron resultados de 98 % de eficacia para MXD y 62 % para IVM. En Argentina, también se describen resultados equivalentes en bovinos donde MXD posee una mayor eficacia comparada con otras LMs (Lifschitz *et al.* 2010a; Fazzio *et al.* 2016).

Resulta relevante determinar si las características farmacocinéticas de estos compuestos pueden explicar estas diferencias. Las características farmacocinéticas de las diferentes LMs han sido extensamente estudiadas en plasma de ovinos sanos, sin embargo, la información cinética emergente de ensayos comparativos con animales parasitados es escasa (Lespine *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2006). Baggot y Mc Kellar (1994) sugieren que si bien una carga parasitaria baja puede no interferir la absorción gastrointestinal, la existencia de nematodos normalmente afecta a dicho proceso y, en consecuencia, influye en la biodisponibilidad de los antihelmínticos por vía oral. Es por ello que en el presente trabajo se caracterizó en forma comparada y estandarizada la cinética plasmática y las concentraciones en los sitios de localización parasitaria de tres LMs (MXD, ABM e IVM) administradas por vía oral a corderos parasitados naturalmente.

La cinética comparativa mostró que no hubo diferencias significativas en la exposición sistémica (medida como ABC) luego de la administración de MXD, ABM e IVM a corderos infestados con nematodos resistentes. La persistencia de las concentraciones de MXD en plasma fue más prolongada comparada a la de ABM e IVM. La mayor lipofilicidad de MXD así como su menor afinidad por el transportador Gp-P pueden explicar la mayor persistencia de este compuesto en el organismo (Lanusse *et al.* 1997; Lespine *et al.* 2007; Prichard *et al.* 2012). Elevadas concentraciones de fármaco fueron medidas en los sitios de localización parasitaria en el TGI luego de la administración IR de las tres LMs. Estos perfiles de concentraciones fueron significativamente más elevados a las concentraciones de cada fármaco en sangre. Las mayores de concentraciones de fármaco fueron medidas en los contenidos abomasales e intestinales. El cociente entre las concentraciones de las LMs en los contenidos y las mucosas del TGI estuvieron entre 1,08 y 6,9

(abomaso) y entre 0,76 y 1,62 (intestino delgado). Estos valores fueron significativamente mayores a los obtenidos cuando las LMs son administradas por la vía SC (Lifschitz *et al.* 1999, 2000a) lo que demuestra la alta exposición a la que se ven expuestos los parásitos gastrointestinales luego de la administración enteral de las LMs.

Para tratar de comprender más profundamente la acción de estos fármacos, se realizó por primera vez la cuantificación de MXD, ABM e IVM en un nematodo abomasal obtenido de corderos naturalmente parasitados y en diferentes tiempos post-tratamiento. Tal como fue descripto en el punto 6.1.2., la concentración de fármaco medida en el contenido abomasal para las tres moléculas bajo estudio reflejaron la cantidad de droga acumulada en el parásito adulto de *H. contortus*. Este hallazgo muestra que existe una ventaja en el patrón de entrada transcuticular para los nematodos que se localizan en el TGI cuando se administran fármacos lipofílicos por vía oral y que alcanzan una gran disponibilidad de droga soluble en la luz del TGI. Es interesante remarcar que luego de la administración de las LMs por la vía oral hay una buena correlación entre la concentración de droga alcanzada en sangre y la alcanzada en la mucosa del tracto gastrointestinal ($r = 0,78$; $P \leq 0,0001$). Sin embargo, esta correlación no existe entre los perfiles de droga en la circulación sistémica y aquellos medidos tanto en el contenido digestivo ($r = 0,01$; $P \leq 0,953$) o en los especímenes de *H. contortus* ($r = 0,02$; $P \leq 0,892$). Los perfiles de concentración medidos entre los especímenes adultos de *H. contortus* para las tres moléculas de LMs administradas por vía oral, reflejaron lo que ocurrió en el contenido abomasal con una correlación positiva ($r = 0,62$; $P \leq 0,0002$) tal como sucedió en el primer experimento con IVM.

Existen evidencias previas que sugieren que IVM, ABM y MXD comparten su mecanismo de acción y de resistencia. No obstante, a la dosis terapéutica recomendada para rumiantes, MXD fue más efectiva respecto a las AVM bajo estudio. La concentración del fármaco en los tejidos del TGI y en los parásitos durante los primeros 2 días post- tratamiento es relevante para marcar el patrón de efectividad de las LMs frente a los nematodos resistentes de ovinos. En este estudio, las concentraciones de los tres fármacos en *H. contortus* fueron similares a los 0,5 y 1 día post-tratamiento. Las concentraciones de MXD fueron significativamente menores a los 2 días post-tratamiento comparado con ABM e IVM (FIGURA 16). Sin embargo a pesar de que se midieron concentraciones de MXD menores en los tejidos del parásito, el total de masa parasitaria de *H. contortus* recuperados del abomaso luego del tratamiento fue mucho menor, principalmente a los 2

días post administración coincidentemente con el mayor porcentaje de eficacia obtenido para este fármaco (FIGURA 18).

Si bien existen diferencias bien descritas en la disposición de la cinética plasmática entre MXD, ABM e IVM (Lanusse *et al.* 1997; Toutain *et al.* 2004) que son coincidentes con los resultados obtenidos en este trabajo, estas diferencias son insuficientes para explicar los patrones de eficacia diferenciales observados. De esta manera, las características farmacodinámicas de cada fármaco parecerían jugar un rol importante en la actividad antihelmíntica frente a los nematodos GI y principalmente frente a los nematodos resistentes. Las LMs ejercen su acción a través de la unión los canales de cloro ligado a glutamato en el parásito. Recientemente, Prichard *et al.* (2012) reportó un patrón diferencial de interacción entre las LMs y este receptor. Las diferencias en la estructura química entre MXD e IVM pueden ser suficientes para determinar una unión diferencial al canal del cloro ligado a glutamato y esto concuerda con lo recientemente propuesto para el modelo de unión de IVM a dicho receptor (Hibbs y Gouaux, 2011).

Es reconocida generalmente la idea que la resistencia a una droga dentro de una clase de antihelmínticos confiere resistencia a toda la clase, fenómeno denominado como resistencia lateral (Shoop *et al.* 1995; Sangster, 1999). Muchos datos publicados sugieren que estos fármacos tienen similares mecanismos de acción y de resistencia (Conder *et al.* 1993; Forrester *et al.* 2004; Njue *et al.* 2004). De hecho algún grado resistencia lateral existe y es demostrada por los trabajos publicados por Shoop *et al.* (1993); Molento *et al.* (1999) y Ranjan *et al.* (2002). No obstante, los mecanismos de resistencia no son exactamente idénticos (Prichard *et al.* 2012) y frente a determinados géneros MXD puede presentar una mayor potencia relativa que la IVM (Lanusse *et al.* 2013). Existen numerosos antecedentes de que esta mayor eficacia puede ser solo de carácter temporal (Kaplan, 2004; Kaplan *et al.* 2007; Anziani y Fiel, 2015) y está supeditada a la selección de genes adicionales de resistencia (Le Jambre, 2005). Además, la resistencia a MXD es cada vez más frecuente en diferentes lugares del mundo como lo describen numerosos autores (Love, 2003; Hughes *et al.* 2004; Thomaz Soccol *et al.* 2004) y en nuestro país (Anziani y Fiel, 2004; Suarez *et al.* 2013; Anziani y Muchiut, 2014). En el presente trabajo MXD conserva elevados valores de eficacia, aun cuando existe una marcada resistencia a ABM e IVM, este concepto es coincidente con los expuestos por varios autores, entre ellos Kaplan *et al.* (2007) y Anziani *et al.* (2008). Tal lo demostrado en este trabajo de tesis, la actividad diferencial no estaría basada en un mayor perfil de

llegada por parte de MXD a los parásitos resistentes, sino a las características farmacodinámicas distintivas. Nuestros resultados indican que MXD puede tener cierta aplicación potencial en el control de *H. contortus* y otros nematodos resistentes a IVM en corderos, sin embargo no se esperaría que los valores de eficacia se mantengan a lo largo del tiempo si se incorpora este fármaco como tratamiento antihelmíntico habitual.

6.1.3. Efecto de la dosis sobre la farmacocinética y la farmacodinamia de IVM y MXD

Las características farmacocinéticas de los antihelmínticos (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) determinan la concentración del fármaco que llega a los sitios de localización parasitaria. Desde un punto de vista farmacológico, un fármaco antihelmíntico necesita tener la mejor oportunidad para actuar en el sitio de acción a nivel del parásito “blanco” (Hennessy, 1997). Este concepto resulta de gran importancia teniendo en cuenta que el incremento de la resistencia a las drogas antihelmínticas usadas en rumiantes se está convirtiendo en un serio problema (Kaplan and Vidyashankar, 2012). Con el desarrollo de resistencia a los antihelmínticos, la cantidad de fármaco que llega al interior de los parásitos no es suficiente para eliminarlos y su efecto antihelmíntico decae. Frente a esta perspectiva, en parásitos resistentes el incremento de la exposición al fármaco ya sea por aumento de la concentración, o por el tiempo de exposición, o ambos, puede ayudar a recuperar la eficacia de los antihelmínticos (Várady *et al.* 1996; Barrère *et al.* 2012; Álvarez *et al.* 2015; Lanusse *et al.* 2015).

En este contexto, es necesaria la búsqueda de estrategias que optimicen el potencial de los fármacos antiparasitarios para extender su vida útil, en particular en los establecimientos donde todavía la resistencia no está totalmente instalada. En este trabajo de tesis se evaluó en primer lugar la influencia de la vía de administración y posteriormente se estudió cuál de las LMs presenta una acción preferencial ante un escenario de resistencia. Finalmente en una combinación de las estrategias evaluadas, se estudió como el incremento de la dosis de las LMs administradas por vía IR afecta la acumulación de droga en el sitio de localización parasitaria y en los parásitos mismos y por lo tanto en la eficacia clínica. Con respecto a las LMs, existe una gran cantidad de información acerca de las propiedades farmacológicas, su farmacocinética y farmacodinamia en varias especies animales (Campbell, 1989; Vercruysse y Rew, 2002). Sin embargo, faltan estudios

farmacocinéticos-farmacodinámicos en relación a la dosis en rumiantes infestados con parásitos resistentes.

En el presente trabajo fue evaluada la acumulación de antihelmínticos en los sitios de localización parasitaria del TGI de corderos naturalmente parasitados y en especímenes de *H. contortus* adultos colectados luego del tratamiento por vía IR con IVM y MXD a la dosis de 0,2 mg/kg y de 0,4 mg/kg. Basados en los principios farmacológicos, todas las estrategias que maximizan la disponibilidad de drogas (exposición) en la interfase hospedador-parásitos pueden incrementar el efecto antihelmíntico. Los incrementos obtenidos en las concentraciones de fármacos en el sitio de localización parasitaria se reflejaron también en un aumento de las concentraciones de droga en los parásitos.

A nivel plasmático, los principales parámetros cinéticos como el C_{max} y ABC fueron significativamente mayores luego de la administración de IVM y MXD a la dosis de 0,4 mg/kg comparada con la dosis de 0,2 mg/kg (dosis recomendada). Como el proceso de eliminación para IVM y MXD no fue afectado por la administración del doble de la dosis (cinética de orden 1), los parámetros cinéticos que reflejan la persistencia de ambos fármacos en el organismo no fueron modificados. (TABLAS 38 y 39). En los sitios gastrointestinales de localización parasitaria, se alcanzaron elevadas concentraciones de fármaco tal como fue demostrado en esta Tesis luego de la administración IR de las LMs. En el presente trabajo las concentraciones de IVM y MXD en el contenido abomasal en el día 1 fueron entre 21 y 36 veces más altas que aquellas medidas en el plasma (FIGURA 21).

Existió una importante correlación entre las concentraciones de IVM y MXD recuperadas en el contenido abomasal y aquellas medidas en los especímenes de *H. contortus* adultos. Las mayores concentraciones de IVM y MXD se midieron en los parásitos luego de la administración de 0,4 mg/kg comparada con la administración de 0,2 mg/kg. La misma relación de dosis-concentración fue observada en el contenido intestinal y en la mucosa del abomaso e intestino. Tal como fue observado a lo largo de esta tesis, las concentraciones de fármaco en los tejidos y contenidos del tracto gastrointestinal durante los 2 – 3 primeros días post-tratamiento son relevantes para la efectividad de las LMs contra los parásitos resistentes en ovinos. Por lo tanto la acumulación del fármaco observada en los nematodos luego de la administración de IVM y MXD a 0,4 mg/kg puede ser de utilidad para incrementar la eficacia frente a parásitos resistentes. Recientemente, Lifschitz *et*

al. (2014) encontraron resultados similares para monepantel luego de su administración oral en ovinos. La alta disponibilidad de monepantel en el contenido abomasal obtenido durante los primeros 2 días post-tratamiento facilitó la acumulación dentro del parásito por el pasaje transcuticular. Como fue corroborado en algunos ensayos previos, MXD es efectivo contra algunas especies de nematodos IVM resistentes a dosis terapéuticas recomendadas para rumiantes (Barnes *et al.* 2001; Vickers *et al.* 2001). En el presente trabajo, la eficacia de IVM a la dosis de 0,2 mg/kg fue similar a la dosis de 0,4 mg/kg (TABLA 28). La eficacia de IVM contra *H. contortus* fue de 0 % para ambas dosis. Por el contrario, a la dosis recomendada de 0,2 mg/kg la eficacia de MXD fue mayor (86,7%) que la observada para IVM, pero pareciera que la actividad de MXD *in vivo* podría estar decreciendo con el uso reiterado. Es interesante que mientras la doble dosis de IVM parece no ser efectiva contra *H. contortus*, luego de la administración de MXD a la dosis de 0,4 mg/kg se obtuvo un alto porcentaje de eficacia (98,2%). En este sentido, un patrón diferencial de interacción con los canales de cloro ligados a glutamato, diferencias en las propiedades físico-químicas, en el comportamiento farmacocinético y en los mecanismos de resistencia pueden en conjunto explicar la mayor eficacia de MXD *in vivo* (Prichard *et al.* 2012; Demeler *et al.* 2013b).

En los últimos años, diferentes estudios evaluaron el efecto de la dosis de diferentes antihelmínticos sobre la eficacia contra nematodos resistentes. Álvarez *et al.* (2012) recientemente demostraron tras incrementar la dosis de ABZ entre 5 a 9 veces, se logró una absorción gastrointestinal proporcional en corderos que se asoció con el incremento en el plasma de los metabolitos de ABZ. También, Barrère *et al.* (2012) demostraron que el aumento de la exposición sistémica logrado luego de los tratamientos con altas dosis de ABZ se correlacionan con un incremento en la eficacia del fármaco frente a un aislamiento de *H. contortus* resistente. La evaluación farmacocinética-farmacodinámica de tres diferentes niveles de dosis de IVM administrada IR (0,2, 1 y 2 mg/kg) fue recientemente realizada en ovinos infestados con *H. contortus* resistente (Álvarez *et al.* 2015). Se corroboró una proporcionalidad relacionada a la dosis que se reflejó en los parámetros que reflejan la biodisponibilidad sistémica (ABC y Cmax). La eficacia clínica aumentó de 48 % (0,2 mg/kg) hasta 96 % (1 mg/kg) y 98 % (2 mg/kg) lo cual demuestra que el aumento de la exposición de los parásitos al fármaco puede impactar directamente en la eficacia.

El grado de susceptibilidad o resistencia de la población de nematodos es primordial para determinar cuál será el impacto del incremento de la exposición en la eficacia. Algunos autores, determinaron

que si la respuesta al fármaco supera en exceso al 80 % de su máximo efecto, el efecto final será insensible a cambios notables en la concentración de fármaco (Holford y Sheiner, 1981). De esta manera si el aumento de la dosis se evalúa en animales infestados con una población susceptible de parásitos, el éxito terapéutico esperado luego de la exposición a concentraciones crecientes de fármaco puede ser indistinguible. Sin embargo, si los animales están parasitados con nematodos resistentes, la respuesta clínica al incremento de la exposición al fármaco en el sitio de acción será notablemente mejor (Martínez, 2010).

En conclusión, la administración de IVM y MXD a 0,4 mg/kg comparado con 0,2 mg/kg se traduce en un incremento en la exposición al fármaco de los sitios de localización parasitaria y un incremento en las concentraciones dentro de los nematodos resistentes. El aislamiento de *H. contortus* utilizado en este trabajo presenta valores extremadamente elevados de resistencia, por ello, la administración de un tratamiento a doble dosis fue sólo efectivo para MXD. El inconveniente de recomendar altas dosis de antihelmínticos puede estar asociado a la selección de nematodos altamente resistentes, además del impacto en los residuos de fármacos y periodos de retirada. De esta manera esta estrategia debe ser usada sólo selectivamente ante la presencia de parásitos resistentes para atenuar el impacto clínico de los mismos sobre los animales y siempre bajo supervisión profesional.

6.2. Evaluación de la actividad *in vitro* de las LMs contra *H. contortus* resistente.

La comprensión del modo de acción de un antihelmíntico y de los mecanismos de resistencia es de suma importancia para el control de la resistencia o al menos para retrasar su progreso y desarrollar nuevas técnicas diagnósticas. A pesar de las investigaciones que se realizan desde hace varios años en distintos lugares del mundo, el modo y el sitio de acción de las LMs no están completamente dilucidados. Las LMs inhiben el desarrollo larval, la motilidad, la bomba faríngea (Kohler, 2001), pero está en continuo debate cuál es el sitio primario de acción, si es la inhibición de la bomba faríngea o de la motilidad. Algunos autores (Geary *et al.* 1993; Richards *et al.* 1995; Sheriff *et al.* 2002) encontraron que las concentraciones para inhibir la bomba faríngea son menores que las requeridas para inhibir la motilidad en la mayoría de las especies. Sin embargo, observaciones realizadas por Gill y Lacey (1998) y también por Sheriff *et al.* (2005) sugieren que la parálisis de los músculos somáticos es más importante para la acción *in vivo* que la inhibición de la alimentación.

Un estudio reciente *in vitro* describe la inhibición y/o disminución en la motilidad de nematodos adultos en concentraciones más bajas que las requeridas para la inhibición de la alimentación (0,015 nM para ABM para motilidad comparada con 0,16 nM para alimentación) (Kotze *et al.* 2012). Este panorama remarca el contexto en el cual el uso masivo de estos fármacos ha superado ampliamente al avance del conocimiento sobre las mismas teniendo en cuenta que todavía se desconoce con exactitud su mecanismo de acción y de resistencia.

En *H. contortus* están descriptos varios sitios de acción probables para las LMs incluyendo la inhibición de la actividad faríngea, de la contracción de la musculatura somática y efectos en neuronas sensoriales. Existe evidencia que el sitio de acción primario en nematodos es por inhibición de los canales de cloro ligados a glutamato (GluCl) en nervios y uniones interneuronales donde generan una pérdida de los iones de cloro e hiperpolarización dando lugar a la inhibición. *H. contortus* tiene una familia de genes que codifican para la subunidad del receptor que forman esos canales de cloro (Wolstenholme y Rogers, 2005; McCavera *et al.* 2007). Diferentes subunidades del receptor GluCl se localizaron en tejidos neuromusculares incluyendo el sistema motoneuronal somático, especialmente en las comisuras y el cordón nervioso ventral, las células de la faringe y neuronas sensoriales en la región cefálica (Portillo *et al.* 2003). Dada la capacidad de las LMs de causar relajación y parálisis, las neuronas inhibitorias en estas regiones somáticas son probables sitios de acción de las LMs y la resistencia a estos compuestos está también desarrollada en estos sitios (Demeler *et al.* 2014).

Basados en los conocimientos actuales del sitio de acción y con el fin de proveer herramientas para el diagnóstico y la caracterización de la resistencia a los antihelmínticos, en los últimos años se avanzó en la estandarización de métodos *in vitro*. El monitoreo del nivel de resistencia adquiere vital importancia teniendo en cuenta que cuando se detecta una falla terapéutica en las explotaciones pecuarias a menudo es demasiado tarde para prevenir el desarrollo de resistencia (Demeler *et al.* 2010b). El desarrollo de técnicas moleculares para detectar marcadores de resistencia a nivel de campo en forma masiva todavía no se encuentra disponible a pesar de diferentes avances ocurridos en este sentido para algunos grupos de fármacos (Barrère *et al.* 2013). Para retardar el desarrollo de resistencia es primordial su detección en estadios tempranos de desarrollo. Además es apremiante poder contar con pruebas de laboratorio que permitan determinar cuáles fármacos aún son efectivos

contra una población de parásitos específica en condiciones de campo (Demeler *et al.* 2010a). Para esto se han evaluado diferentes estudios *in vitro* durante los últimos 30 años. Dentro de los test *in vitro* más utilizados se encuentran el TEH que sirve para medir la efectividad de los BZM, el TDL que está relacionado con la actividad de la bomba faríngea y músculos somáticos de las larvas de parásitos y el TIML que mide el efecto de las drogas sobre la músculos somáticos de las L3 de los nematodos (Demeler *et al.* 2013a) utilizados principalmente para LMs.

Aunque algunos de estos métodos se han propuesto como una herramienta útil para el diagnóstico temprano de resistencia (Taylor *et al.* 2002, Coles *et al.* 2006), han existido importantes dificultades en el desarrollo de estas metodologías y en la interpretación de la información surgida de las mismas relacionadas a la sensibilidad de la prueba, el rango de concentraciones a utilizar, la solubilidad de las drogas, y principalmente el hecho de que no se hayan podido correlacionar los resultados con la información de las pruebas *in vivo*. En este trabajo de Tesis se desarrolló un método para caracterizar la actividad *in vitro* de las LMs contra *H. contortus* tomando como modelo a IVM. El objetivo principal de dicho desarrollo fue obtener la suficiente sensibilidad como para diferenciar aislamientos de poblaciones parasitarias susceptibles de resistentes. Se eligió el TIML debido al posible modo principal de acción de la IVM sobre los músculos somáticos de los nematodos. Este test, a diferencia de otros, tiene la ventaja de poder cuantificar el efecto de parálisis en forma directa a través del conteo de larvas que son capaces de migrar a través de una malla, en vez de la observación visual directa sobre la motilidad que se realiza en otras pruebas de motilidad. (Kotze *et al.* 2006). Al igual que lo descrito por otros autores, el método debió evaluarse y adaptarse a diferentes condiciones de trabajo. Por ejemplo, se cambió la temperatura de incubación, probablemente debido a que los aislamientos trabajados están adaptados al clima de esta región, encontrando mejores resultados a temperaturas más bajas (entre 24 y 26 °C) que las descritas por Demeler *et al.* (2010a). También surgieron problemas de solubilidad de los fármacos, por lo que se debieron adaptar las concentraciones utilizadas y mantener las mismas dentro del rango de concentraciones encontradas en los *H. contortus* recolectados post tratamiento en los ensayos *in vivo*. El protocolo de trabajo que se utilizó como base para desarrollar el método, fue diseñado para estandarizar el test en diferentes países de Europa. Este protocolo establece el material necesario, los tiempos, las diluciones, etc, para poder lograr resultados comparables (Demeler *et al.* 2010a). Sin embargo, no hay hasta el momento datos disponibles de los resultados de este test en la

investigación de resistencia en nematodos GI de rumiantes, ni tampoco datos de repetitividad, ni del uso práctico de este test comparando diferentes regiones climáticas. Haciendo hincapié en la repetitividad del test, los porcentajes de larvas sobrevivientes no siguen un patrón en algunas ocasiones, por lo que se decidió descartar estas repeticiones. Este hecho hace que la utilización del test para el diagnóstico práctico y masivo de resistencia utilizando poblaciones provenientes de diferentes establecimientos sea muy difícil.

En estudios realizados por otros autores, con métodos diferentes o adaptados, Gill *et al.* (1991), encontraron valores de DI50 entre 3×10^{-7} – $4,9 \times 10^{-7}$ M para un aislamiento susceptible de *H. contortus* (Mc Master). Dicho aislamiento es de referencia ya que no tiene historia de exposición a antihelmínticos y fue aislado en Armidale, NSW en 1976. En ese trabajo evaluaron 6 aislamientos de campo resistentes de Sud África y obtuvieron DI50 entre 8×10^{-7} y $2,6 \times 10^{-6}$ M. Posteriormente, Rothwell *et al.* 1993 encontraron DI entre $9,3 \times 10^{-8}$ y $4,72 \times 10^{-7}$ utilizando el aislamiento de *H. contortus* Mc Master. Gill *et al.* (1993) obtuvieron resultados similares utilizando el mismo aislamiento de *H. contortus* McMaste ($3 \times 10^{-7} \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M). Douch *et al.* (1994) utilizó un método diferente para probar el efecto sobre la motilidad utilizando un aislamiento de *T. colubriformis* Mc Master y de *O. circumcincta* Mc Master y un aislamiento de *H. contortus* y encontró que IVM podía inhibir la migración larval en concentraciones entre 1×10^{-7} y 1×10^{-4} M, sin embargo la DI50 para *H. contortus* no fue publicada.

En estudios más recientes, Kotze *et al.* (2006) encontró valores de DI50 de $1,1 \times 10^{-6}$ M en el aislamiento susceptible y de $1,87 \times 10^{-6}$ M en el aislamiento resistente, con un FR de 1,7; mientras que Demeler *et al.* (2010^a) obtuvo valores de DI50 de $9,14 \times 10^{-7}$ M y $7,7 \times 10^{-4}$ M (FR: 8,4). Por otra parte Demeler *et al.* (2013a) obtuvo valores de $6,7 \times 10^{-7}$ M y $7,5 \times 10^{-7}$ M (FR: 1,12) para los aislamientos susceptibles y resistentes respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el aislamiento susceptible presenta un valor de DI50 de $1,81 \times 10^{-7}$ M, mayor a los obtenidos por Demeler *et al.* (2010a, 2013a) y se asemeja el valor obtenido por Kotze *et al.* (2006), para el aislamiento resistente. El valor obtenido para la DI50 del aislamiento resistente mostró valores comparables a los obtenidos por Demeler *et al.* (2010a). Las curvas dosis- respuesta ($r = 94$ y 95 %) y la DI50 para IVM tuvieron una diferencia

significativa ($p \leq 0,05$) entre el aislamiento susceptible y resistente. Se observó que la diferencia es más marcada cuando se comparan la DI 90, 95 y 99, demostrando que a valores de inhibición cercanos a los utilizados con los test *in vivo*, la diferencia entre aislamientos es más notoria (TABLA 42). El factor de resistencia fue notablemente mayor (FR: 20,1) a los obtenidos por otros autores.

Basados en las observaciones de este trabajo, el TIML resulta una prueba eficaz para establecer diferencias entre aislamientos susceptibles de resistentes, sin embargo, la variabilidad de los factores que influyen en los resultados de la prueba, la dificultad en reproducir resultados similares a los obtenidos en Demeler *et al.* (2010a), obtener los materiales y la necesidad de trabajar con aislamientos puros de nematodos, hacen que esta prueba sea difícil de implementar para el diagnóstico de resistencia y reemplazar el test de reducción de huevos en materia fecal que se realiza *in vivo*. Deben realizarse más evaluaciones para poder mejorar el método y que pueda ser utilizado como una herramienta diagnóstica.

Si bien con los ensayos *in vitro* como el TIML podemos obtener información sobre la actividad antihelmíntica de las LMs, es importante tener en cuenta que su acción en el animal tratado se ejerce sobre estadios larvarios (usados en el TIML) y principalmente sobre adultos. Una vez realizado un tratamiento antihelmíntico, el ingreso de los fármacos a los parásitos adultos dentro del TGI del animal es un factor clave para alcanzar una adecuada eficacia. De esta manera, resulta relevante poder contar con pruebas de laboratorio que utilicen estadios adultos de nematodos gastrointestinales y que aporten información sobre la acumulación de las LMs en los mismos.

A efectos de corroborar los resultados obtenidos *in vivo* en este trabajo de Tesis, se evaluó también la acumulación *ex vivo* de IVM y MXD en especímenes adultos de *H. contortus*. Para ello se incubaron *H. contortus* adultos a 0,5 μM y 5 μM de IVM y MXD. La concentración de 0,5 μM se utilizó porque refleja las concentraciones obtenidas *in vivo* en el capítulo III, en el contenido abomasal luego de la administración de 0,2 mg/ml por vía oral en corderos (dosis terapéutica). Además se realizaron incubaciones durante 15 minutos y 3 horas. Se encontraron efectos tanto de la concentración como del tiempo de exposición en la acumulación de IVM y MXD en *H. contortus*. Fueron medidas cantidades significativamente mayores ($p \leq 0,05$) de ambos fármacos en los nematodos incubados a 5 μM . También fueron significativamente mayores las cantidades

acumuladas en los especímenes adultos de *H. contortus* (5 a 7 veces) luego de 3 horas de incubación comparado con 15 minutos. El ingreso de otras drogas antihelmínticas como los BZM fueron estudiadas tanto en nematodos, trematodos y cestodos (Álvarez *et al.* 1999, 2001; Mottier *et al.* 2006). Estos estudios demostraron que la concentración efectiva que llega al sitio de acción dentro de los parásitos está determinada principalmente por la lipofilicidad de la droga y por la permeabilidad de la cutícula externa del parásito, siendo los resultados en nematodos marcadamente diferentes a los obtenidos en trematodos y cestodos. En un estudio reciente realizado por Vokral *et al.* (2012), se evaluó el ingreso de flubendazol en *H. contortus*. En dicho estudio se corroboró que la difusión pasiva es el principal mecanismo de ingreso y eflujo de este fármaco dentro de este nematodo. En cuanto a las LMs existe escasa información sobre la acumulación de estos fármacos sobre estadios adultos de *H. contortus*. Los hallazgos del presente trabajo confirman que el incremento de la exposición al fármaco para IVM y MXD se reflejan como un incremento en la cantidad de fármaco recuperada en los *H. contortus*. Esta observación pudo ser comprobada tanto en los experimentos *ex vivo* como *in vivo*. Sin embargo, como la acumulación en los experimentos *ex vivo* miden la concentración del fármaco en el nematodo entero, este método no suplanta la información sobre los potenciales mecanismos de resistencia que pueden reducir el acceso de los fármacos al sitio de acción. Esta limitación metodológica puede explicar las concentraciones de fármaco similares medidas en *H. contortus* vivos y muertos en la prueba *ex vivo*. Además, este método demuestra las dificultades en reflejar las condiciones *in vivo* del TGI, donde el fármaco es distribuido entre los tejidos de la mucosa, el material particulado de la ingesta y los fluidos gastrointestinales (Lifschitz *et al.* 2000a, 2005). Queda claramente demostrado que cuando los parásitos son expuestos a mayores concentraciones de LMs y durante mayor tiempo, las concentraciones de fármacos que ingresan al mismo son mayores lo cual puede tener un impacto directo en la efectividad del fármaco.

6.3. Estudio de expresión de glicoproteína-P2 en *H. contortus* resistente a LMs

La RA es una constante amenaza para la sanidad y la producción de las diferentes especies animales. Desde hace varias décadas el control de los nematodos gastrointestinales se basó en el tratamiento con antihelmínticos y probablemente esta tendencia no cambie en los próximos años. Teniendo en cuenta que el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos es un proceso lento y muy costoso son

necesarias nuevas estrategias tendientes a mejorar u optimizar el control actual basado en el control químico.

Aunque la resistencia a las LMs parece ser multigénica (Prichard *et al.* 2007) la concentración final del antihelmíntico en el parásito es determinante para definir su eficacia. Aumentar la concentración del fármaco en cantidad y en el tiempo es un importante desafío y se debe lograr mediante el manejo de la absorción, distribución, metabolismo y la eliminación de las LMs, tanto en el hospedador como en el parásito. Recientemente por estudios moleculares, bioquímicos y farmacocinéticos se observó que las moléculas centrales de todo este proceso son los transportadores celulares de membrana de tipo ABC tanto en el hospedador como en el parásito. (Prichard, 2007; Lespine *et al.* 2008). La participación de estos transportadores en el comportamiento farmacocinético de diferentes fármacos es considerada un nuevo paradigma dentro de la farmacología humana y veterinaria. La interacción de un número importante de fármacos con estos transportadores es un elemento clave con una gran implicancia terapéutica.

La Gp-P es una proteína transportadora de membrana asociada al fenómeno de resistencia a múltiples drogas (MDR). 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 (Mealey, 2004). 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. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la Gp-P funciona como una bomba de eflujo que secreta en forma activa una gran cantidad de compuestos no relacionados, desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. A nivel intestinal, la Gp-P limita la absorción y difusión transepitelial provocando modificaciones en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral (Lin, 2003; Ballent *et al.* 2005).

En los últimos años se estudió la interacción entre los fármacos pertenecientes al grupo de las LMs y la Gp-P. Estudios *in vivo* utilizando ratones knock out para el gen MDR1 revelaron una sensibilidad aumentada a IVM que se manifestó con signos de neurotoxicidad y muerte (Geyer *et al.*, 2009). A su vez, IVM ha sido descrita como un potente inhibidor de la Gp-P *in vitro* (Didier y Loor, 1996). Varios autores evaluaron la interacción *in vivo/ex vivo* de las LMs con la Gp-P de mamíferos (Laffont *et al.* 2002; Ballent *et al.* 2006; Lespine *et al.* 2007). Los estudios *in vitro* proveen clara

evidencia que MXD tiene una menor afinidad por la Gp-P mamífera comparada con las AVM (Lespine, *et al.* 2007). Mientras que IVM mostró la mayor afinidad por la Gp-P, la potencia de MXD para inhibir a la misma fue 10 veces menor (Lespine *et al.* 2007). Esta diferencia puede explicar diferencias en el comportamiento farmacocinético y en los mecanismos de resistencia para IVM y MXD (Lanusse *et al.* 1997; Prichard *et al.* 2012). Además, en los últimos años se evaluaron los efectos de la co-administración *in vivo* de las LMs con diferentes agentes moduladores en distintas especies animales (Lifschitz *et al.* 2002, 2004, 2010 a y b; Ballent *et al.* 2007, Alvinerie *et al.* 2008). Dichos estudios mostraron que la coadministración de las LMs con diferentes sustancias moduladoras de la Gp-P aumentaron las concentraciones de las mismas en el plasma y en los sitios de localización parasitaria en diferentes especies animales.

Los estudios iniciales de la actividad de la Gp-P de mamíferos en relación a las LMs, llevaron a investigar si los parásitos resistentes utilizaban un mecanismo similar para protegerse de las LMs. Los datos generados en los últimos años confirmaron esta hipótesis (Prichard, 2007). En 1998 fue demostrado por primera vez que aislamientos de *H. contortus* resistentes a IVM mostraron niveles 3,4 veces mayores de Gp-P A (ortólogo de Gp-P2) comparada con el aislamiento sin tratamiento (Xu *et al.* 1998; Van Zeveren, 2009). Esta sobreexpresión podría ser importante para proteger de las toxinas a las neuronas de los nematodos (Prichard *et al.* 2007). Un aumento marcado del eflujo de fármacos en los parásitos mediado por Gp-P fue propuesto como potencial mecanismo de resistencia de IVM (Xu *et al.* 1998).

Estudios realizados en el genoma del parásito modelo *Caenorhabditis elegans* identificaron al menos 15 genes que codifican para Gp-P (Ardelli y Prichard, 2013). La familia génica de las Gp-P parece ser moderadamente bien conservada entre *C. elegans* y los nematodos de rumiantes y por lo tanto es probable que también existan múltiples genes que codifiquen para Gp-P (Lespine *et al.* 2008). De hecho, se han encontrado 9 genes que codifican para la Gp-P en *H. contortus* con un alto grado de identidad con las secuencias de genes en *C. elegans* (Williamson y Wolstenholme 2012). El presente trabajo de Tesis evaluó por primera vez los efectos comparativos entre IVM, ABM y MXD sobre la expresión de Gp-P2 en especímenes de *H. contortus* resistentes recuperados en diferentes tiempos post-tratamiento a partir de corderos tratados, realizando una cinética de expresión *in vivo*. Además se evaluó comparativamente la expresión de la Gp-P2 en aislamientos de poblaciones susceptibles y resistentes de *H. contortus*. Los especímenes de *H. contortus* resistente recuperados a partir de corderos no tratados revelaron altos niveles de expresión de Gp-P2

comparado con los aislamientos susceptibles (FIGURA 39). Estas diferencias denominadas constitutivas no fueron encontradas en los trabajos realizados por Williamson y Wolstenholme (2012) entre aislamientos resistentes y susceptibles de *H. contortus*. Sin embargo, este último estudio fue realizado con estadios larvales de *H. contortus* y si consideramos que los cambios en la expresión de Gp-P ocurren a través de todo su ciclo de vida, principalmente desde los estadios de vida libre hasta estadios parásitos (Nisbet *et al.* 2008), trabajar con estadios larvales podría ser un factor de confusión y explicaría esta discrepancia (Williamson y Wolstenholme, 2012).

En el presente trabajo el tratamiento con IVM incrementó significativamente la expresión de Gp-P2 en los especímenes de *H. contortus* resistentes recuperados de corderos tratados a los 0,5 y 1 días post-tratamiento comparado con los *H. contortus* recuperados de animales sin tratamiento (diferencias de expresión inducible). Sin embargo, los tratamientos con MXD y ABM no indujeron ninguna modificación significativa en el patrón de expresión de Gp-P2 en el nematodo. La sobreexpresión de Gp-P en *H. contortus* recuperados a 1 día post tratamiento con IVM fue previamente reportada al igual que los menores efectos luego del tratamiento con MXD (Prichard y Roulet, 2007). Las razones para explicar las diferencias observadas entre IVM y ABM respecto a la influencia sobre la expresión de Gp-P2 en *H. contortus* permanece aún si esclarecer, aunque se cree que la presencia de un doble enlace en C22-23 en la estructura de ABM podría ser la causa. Estas diferencias podrían jugar un rol importante en las variaciones observadas en la resistencia evaluada *in vivo*. Los parásitos resistentes a IVM muestran cierto grado de resistencia, pero no completa, con MXD como lo expresa en su trabajo Prichard *et al.* (2012). Otros estudios deben realizarse en pos de caracterizar las variaciones de expresión de las diferentes Gp-Ps frente a las LMs y de determinar cuál es el significado funcional de estas variaciones. Estos estudios, podrían ser la base para el diseño de nuevas estrategias para optimizar la utilización de las LMs y del desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas de resistencia basadas en biología molecular.

La regulación de la expresión de Gp-P2 inducida por IVM durante un corto periodo de tiempo fue también demostrada en líneas celulares de hepatocitos (Ménez *et al.* 2012). En dicho trabajo la inducción de Gp-P causada por IVM involucró un incremento de la vida media del ARN mensajero en los hepatocitos, que alcanzó su máximo luego de 24-48 horas post exposición a IVM. Esto concuerda con los niveles observados en los especímenes de *H. contortus* para el mismo compuesto donde los mayores niveles de expresión ocurrieron al momento de mayor exposición de los

nematodos al fármaco antihelmíntico. Estas evidencias ratifican la relación que existe entre el nivel de expresión y actividad de Gp-P en los nematodos y la acumulación de LMs tanto en parásitos susceptibles como resistentes. El potencial rol de las Gp-Ps en la resistencia a IVM en *C. elegans* fue recientemente reportado (Ardelli y Prichard, 2013). En ese trabajo se incrementó la expresión de Gp-P en diferentes aislamientos de nematodos resistentes y susceptibles en presencia de IVM. La inactivación de alguna Gp-P incluida la Gp-P2 resultó en un incremento en la susceptibilidad a la IVM. La consecuencia de la exposición de droga sobre la expresión de Gp-P en los parásitos fue recientemente evaluada *in vitro*. Las larvas de *H. contortus* resistente mostraron mayor nivel de expresión de los genes hasta (12 veces) de Gp-Ps luego de 3 horas de exposición a IVM (Raza *et al.* 2016). Por otra parte la inhibición de las Gp-Ps en los parásitos aumentó la eficacia de las LMs tanto *in vitro* como *in vivo*. La presencia de los moduladores de Gp-Ps como PSC833, verapamil, pluronic 85 y elacridar aumentaron la sensibilidad *in vitro* de las larvas de *H. contortus* y *Cooperia spp.* resistente a IVM (Bartley *et al.* 2009; Demeler *et al.* 2013a; Raza *et al.* 2015). Por otra parte la modulación *in vivo* de la Gp-P también mostró resultados favorables para la eficacia de IVM contra parásitos resistentes tanto en ovinos como en bovinos (Lifschitz *et al.* 2010 a y b; Bartley *et al.* 2012).

Los datos generados tanto en este trabajo de Tesis como en otras publicaciones permiten afirmar que la expresión basal de las Gp-Ps en los parásitos es un factor determinante para la efectividad de las LMs tanto en parásitos susceptibles como en las cepas resistentes. El nivel de expresión de estas proteínas transportadoras puede ser modificado de manera variable ante la exposición de los parásitos a diferentes tipos de drogas incluidas las LMs como un mecanismo rápido de defensa ante la presencia de los fármacos. La inhibición de la actividad de la Gp-Ps aumenta la eficacia de las LMs tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, es necesario conocer más en detalle el tipo de interacción de las LMs con las distintas Gp-Ps de los parásitos. Por otra parte, la identificación de inhibidores potentes y específicos de las Gp-Ps de los parásitos con un efecto mínimo sobre el huésped contribuiría a mejorar la acción de estos fármacos especialmente en cepas resistentes. La relación entre las LMs y la Gp-P en el hospedador y en los parásitos se muestran en la FIGURA 44.

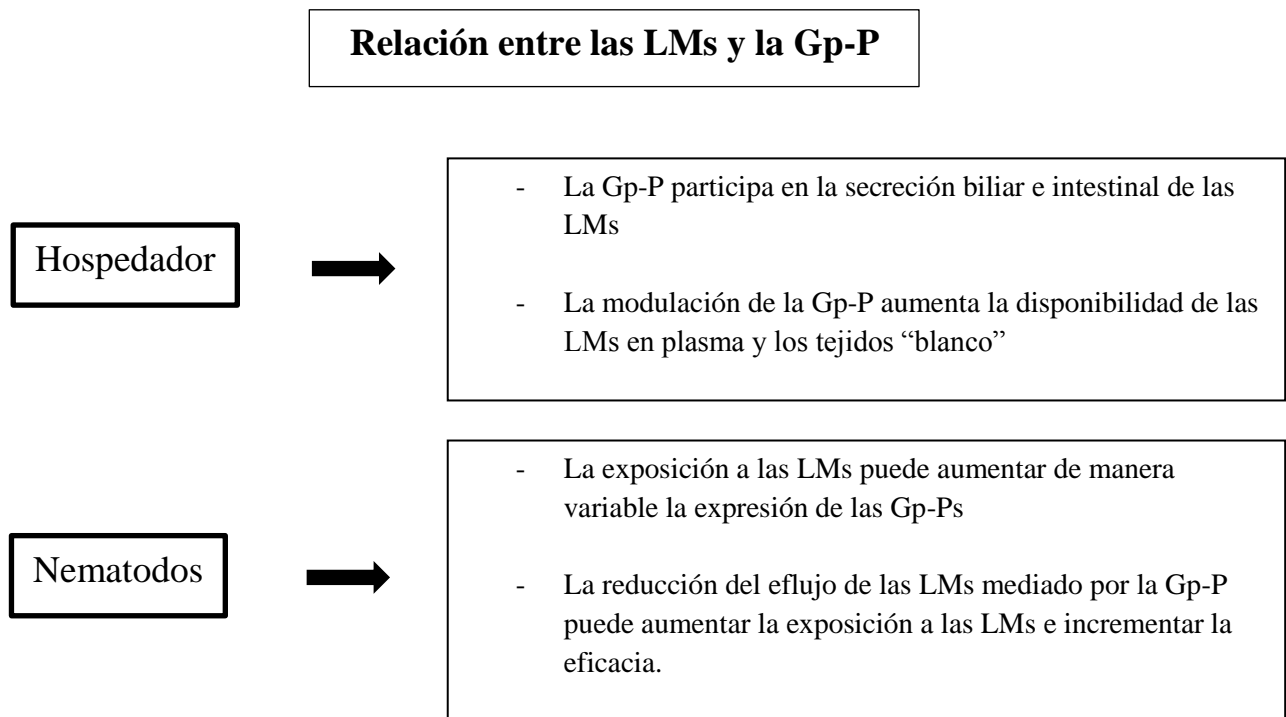


FIGURA 44: Relación entre las lactonas macrocíclicas (LMs) y la glicoproteína-P (Gp-P) en el hospedador y en el parásito.

Capítulo VII

CONCLUSIONES E IMPACTO DE LOS RESULTADOS

La presente Tesis Doctoral generó conocimientos básicos y aplicados que contribuyen al entendimiento de la relación fármaco-parásito-hospedador. En un contexto de creciente resistencia por parte de los nematodos frente a los diferentes grupos de fármacos antihelmínticos, la profundización del conocimiento de las bases farmacológicas de la actividad de diferentes antihelmínticos resulta relevante para optimizar el uso de los mismos. Se focalizó sobre el grupo de fármacos más usados en la medicina veterinaria como son las LMs. En este marco se contribuyó significativamente a la comprensión de la relación droga-parásito-hospedador, fomentando la discusión exhaustiva e interdisciplinaria de los aspectos bajo estudio entre especialistas de las áreas de Farmacología y Parasitología.

Tomando como modelo a *H. contortus* y a los ovinos, se estudió la relación que existe entre las concentraciones de LMs encontradas en la sangre, en los tejidos del tracto gastrointestinal y en los parásitos recuperados de los animales tratados. A su vez se estableció la relación con la eficacia antihelmíntica es decir con la farmacodinamia de estas drogas. Se evaluaron diferentes factores que pueden modificar esta relación y por lo tanto tener fuerte impacto en la terapéutica antiparasitaria. Se demostró que la vía de administración puede ser una herramienta práctica importante cuando el fármaco se enfrenta a nematodos de susceptibilidad reducida. Se midieron por primera vez las concentraciones de IVM en *H. contortus* luego de su administración por la vía IR y SC. Los niveles de droga alcanzados en la circulación sistémica y en los tejidos del TGI luego de la administración de IVM por vía IR y SC resultan en una eficacia equivalente frente a nematodos gastrointestinales susceptibles. Sin embargo, las altas concentraciones del fármaco detectadas en el TGI a los 2-3 días post-tratamiento por vía IR presentan una mayor eficacia cuando se trata de nematodos resistentes. La mayor concentración de IVM dentro de los parásitos luego de la administración por vía IR, permite aseverar que la incorporación de la droga al parásito por vía transcuticular es relevante para la eficacia clínica, aún para aquellos parásitos hematófagos como *H. contortus*. Basados en estos resultados el incremento de la exposición al fármaco modificando la vía de administración puede ser una buena estrategia para matar a los nematodos resistentes heterocigotos presentes en las fases tempranas del desarrollo de la resistencia.

Aunque pertenecen a la misma familia, existen diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas entre las LMs. Las mismas deben ser conocidas en detalle para poder aprovechar dichas características como una ventaja en el control antiparasitario. Los estudios fármaco-parasitológicos llevados a cabo en este Trabajo de Tesis demostraron que a la dosis terapéutica MXD fue más efectiva que IVM y ABM. Aunque MXD mostró una mayor persistencia de concentraciones, el mejor perfil de eficacia mostrada contra parásitos resistentes estaría más relacionado a características farmacodinámicas como pueden ser diferencias en el mecanismo de acción y menor afinidad por los transportadores proteicos involucrados en la resistencia antihelmíntica. Otro aspecto importante también evaluado en esta tesis fue el impacto de la dosis de las LMs en un contexto de resistencia. Se comparó la eficacia y la acumulación de fármacos en los tejidos de los corderos y en *H. contortus*, utilizando IVM y MXD a la dosis terapéutica y al doble de la dosis terapéutica. En un contexto de alta resistencia por parte del aislamiento de *H. contortus* utilizado en estos experimentos, sólo la administración de la doble dosis de MXD fue efectiva. Estos aspectos evaluados en los estudios *in vivo* de este trabajo de tesis demostraron la importancia de la elección de la vía de administración, el fármaco a utilizar y la dosis a administrar cuando se realizan tratamientos con las LMs en ovinos parasitados con nematodos resistentes.

Para entender la relación entre la farmacocinética y los potenciales mecanismos de resistencia a las LMs el presente trabajo de Tesis evaluó por primera vez los efectos comparativos entre IVM, ABM y MXD sobre la expresión de Gp-P2 en especímenes de *H. contortus* resistentes recuperados en diferentes tiempos post-tratamiento a partir de corderos tratados, realizando una cinética de expresión *in vivo*. El tratamiento con IVM fue el único que indujo un incremento significativo de la expresión de Gp-P2 en los especímenes de *H. contortus* resistentes recuperados de corderos tratados a los 0,5 y 1 días post-tratamiento comparado con los *H. contortus* recuperados de animales sin tratamiento. Otros estudios deben realizarse en vistas de profundizar el conocimiento sobre la participación de estos transportadores en los fenómenos de resistencia a estos grupos de fármacos. Estos estudios además podrían ser la base para el diseño de nuevas estrategias para optimizar la utilización de las LMs y del desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas de resistencia basadas en biología molecular.

Existe una necesidad imperiosa de poder diagnosticar los fenómenos de resistencia en sus fases tempranas de desarrollo y así poder planificar el uso racional de los fármacos antihelmínticos. Existe un gran esfuerzo por desarrollar diferentes metodologías *in vitro* que puedan cumplir con este rol utilizando estadios larvarios de nematodos gastrointestinales. En este trabajo de Tesis se desarrolló una metodología *in vitro* para caracterizar la actividad de las LMs frente estadios larvarios de *H. contortus*. El TIML resultó ser una prueba eficaz para establecer diferencias entre aislamientos susceptibles de resistentes, sin embargo, la variabilidad de los factores que influyen en los resultados de la prueba y la dificultad en reproducir los resultados hacen que esta prueba sea difícil de implementar para el diagnóstico de resistencia y reemplazar el test de reducción de huevos en materia fecal que se realiza *in vivo*. Dichas dificultades han sido reportadas por diferentes grupos de investigación a nivel internacional y requieren seguir trabajando en la optimización estos métodos para que puedan ser utilizados como una herramienta diagnóstica. Por otra parte, las incubaciones de adultos de *H. contortus* con diferentes las LMs corroboraron que el tiempo de contacto del parásito con el fármaco y el nivel de concentraciones determina la cantidad de droga que penetra adentro de los nematodos. Estos resultados se correlacionan con lo observado *in vivo* y permiten establecer una aplicación práctica acerca de la importancia del nivel de exposición por parte de los parásitos a las LMs.

En definitiva, las LMs han sido el descubrimiento más impactante desde el punto de vista terapéutico dentro de la medicina veterinaria. Luego de más de 30 años de uso intensivo, su utilidad se encuentra amenazada por el constante incremento en el nivel de resistencia por parte de los nematodos. El presente trabajo de Tesis a través de estudios *in vivo*, *in vitro* y utilizando herramientas de la biología molecular aporta información que es de utilidad para prologar la vida útil de estos fármacos siempre que sean usados de manera racional y con una base de evaluación profesional por el veterinario.

Capítulo VIII

PRODUCCION CIENTÍFICA SURGIDA DE ESTE TRABAJO DE TESIS

La información surgida de esta Tesis Doctoral ha sido difundida nacional e internacionalmente, como artículos en revistas científicas y comunicaciones a Congresos, alcanzando un impacto significativo en cuanto al aporte de nuevas estrategias para mejorar la eficacia en el tratamiento de los NGI gastrointestinales en ovinos.

8.1. ARTÍCULOS COMPLETOS

Measurement of ivermectin concentrations in target worms and host gastrointestinal tissues: Influence of the route of administration on the activity against resistant *Haemonchus contortus* in lambs. Lloberas, M., Álvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Lanusse, C., Lifschitz, A. *Experimental Parasitology* 131 (2012) 304–309.

Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Ballent, M., Mate, L., Lanusse, C., Lifschitz, A. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3 (2013) 20–27.

Comparative pharmacokinetic and pharmacodynamics response of single and double intraruminal doses of ivermectin and moxidectin in nematode-infected lambs. Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Ballent, M., Virkel, G., Luque, S., Lanusse, C., Lifschitz, A., *New Zealand Veterinary Journal*, 63:4, 227-234.

8.2. COMUNICACIONES A CONGRESOS

Lifschitz, A., Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Ballent, M., Virkel, G., Borda, B., Lanusse, C., Measurement of ivermectin concentrations in the host gastrointestinal tissues and in *Haemonchus contortus* recovered from infected lambs. Comparison between subcutaneous and oral treatments. *22nd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Calgary, Canada, Agosto 2009.

Lloberas, M., Entrocasso, C., Lifschitz, A., Alvarez, L., Borda, B., Virkel, G., Lanusse, C.” The route of administration affects ivermectin clinical efficacy against resistant nematodes in sheep”. *22nd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Calgary, Canada, Agosto 2009.

Lifschitz, A., Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocass, C., Ballent, M., Virkel, G., Maté, L, Lanusse, C., “Comparative macrocyclic lactones concentrations in plasma, host gastrointestinal tissues and in resistant *Haemonchus contortus*.” *23st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Buenos Aires, Argentina, Agosto 2011.

Lloberas, M., Entrocasso, C., Alvarez, L., Borda, B., Virkel, G., Lanusse, C., Lifschitz, A. Comparative assessment of ivermectin, abamectin and moxidectin efficacies against resistant nematodes in lambs. *23st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Buenos Aires, Argentina, Agosto 2011.

Lloberas M., Alvarez L., Entrocasso C., Ballent M., Borda B., Virkel G., Maté, L, Lanusse C., Lifschitz A., “Evaluación farmaco-parasitologica de tres lactonas macrocíclicas (ivermectina, abamectina y moxidectin) en nematodos resistentes de ovinos”, XVII Congreso Brasileños de Parasitología Veterinaria, Sao Luis de Maranhao, Setiembre de 2012.

Lloberas, M., Ballent, M., Entrocasso, C., Alvarez, L., Virkel, G., Maté, L., Lanusse, C., Lifschitz A. Expresión de glicoproteína-p en nematodos resistentes de ovinos. *XLIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental*, Mendoza, Noviembre, 2012

Lifschitz, A., Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Ballent, M., Virkel, G., Luque, S., Lanusse, C. Moxidectin remains efficacious against ivermectin-resistant *Haemonchus contortus*: Comparative pharmacological assessment of single and double dose-responses. *24st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Perth, Australia, Agosto 2013.

Capítulo IX

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbot, K.A., Taylor, M.A. y Stubbings, L.A, 2004. Anthelmintic resistance management in sheep. *Veterinary Record*, 154 (23):735-6.
- Alka, R., Gopal, R.M., Sandhu, K.S., Shidu, P.K., 2004. Efficacy of abamectin against ivermectin-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 121 (3-4):277-83.
- Álvarez L., Mottier, M., Sánchez, S., Lanusse, C., 2001. *Ex vivo* diffusion of albendazole and its sulfoxide metabolite into *Ascaris suum* and *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 87 (11): 929-34.
- Álvarez L., Sanchez, C. F. y Lanusse, C., 1999. *In vivo* and *ex vivo* uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22 (2): 77-86.
- Álvarez Sánchez, M.A., Pérez García, J., Cruz Rojo, M.A., Rojo-Vázquez, F.A., 2005. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Veterinary Parasitology* 129 (3-4):291-8.
- Álvarez, L, Suárez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Cantón, C., Lifschitz, A., 2015. Integrated assessment of ivermectin pharmacokinetics, efficacy against resistant *Haemonchus contortus* and P-glycoprotein expression in lambs treated at three different dosage levels. *Veterinary Parasitology*, 210 (1-2): 53-63.
- Álvarez, L., Suárez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., 2012. Dose-dependent systemic exposure of albendazole metabolites in lambs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35 (4): 365-72.

- Álvarez, L.I., Mottier, M.L. y Lanusse, C., 2007. Drug transfer into target helminth parasites. *Trends in Parasitology*, 23 (3): 97-104.
- Alvinerie M., Dupuy, J., Kiki-Mvouaka, S., Sutra, J.F., Lespine, A., 2008. Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. *Veterinary Parasitology*, 157 (1-2): 117-22.
- Alvinerie, M., Sutra, J. F., Galtier, P., 1993. Ivermectin in goat milk after subcutaneous injection. *Veterinary Research*, 24 (5): 417-21.
- Alvinerie, M., Sutra, J.F., Galtier, P., Toutain, P.L., 1994. Microdose d'ivermectine chez la vache laitière: concentrations plasmatiques et résidus dans le lait. *Revue Médecine Vétérinaire*, 145 (10): 761-64.
- Alvinerie, M., Escudero, E., Sutra, J.F., Eeckhoutte, C., Galtier, P., 1998. The pharmacokinetics of moxidectin after oral and subcutaneous administration to sheep. *Veterinary Research*, 29 (2): 113-8.
- Anziani, O.S., Fiel, C.A., 2015. Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 41(1): 34-46.
- Anziani, O.S., Fiel, C.A., 2004. Estado actual de la resistencia antihelmíntica (nematodos gastrointestinales) en bovinos de la Argentina. *Veterinaria Argentina*, 21(202): 122-33.
- Anziani, O.S., Fiel, C.A., 2005. Resistencia de los nematodos gastrointestinales a los antihelmínticos: un problema emergente y relevante para la producción bovina nacional. En: *Resistencia a los antiparasitarios internos en la Argentina*. FAO Producción y Sanidad Animal, pp 40-49.
- Anziani, O.S., Muchiut, S., 2014. Resistencia antihelmíntica múltiple (closantel, febendazole, ivermectina y levamisole) en *Haemonchus spp.* parasitando a ovinos en la provincia de Santa Fe. Ineficacia de una triple combinación de estas drogas para su control. *Revista de Medicina Veterinaria*, 95 (1): 22-27.

- Anziani, O.S., Caffè, G., Aguilar, S., Cervilla, N., Litterio, N., Boggio, J., 2008. Eficacia de la moxidectina en el control de aislamientos de *Haemonchus spp.* resistentes a la ivermectina en cabras. *xviii Jornadas Argentinas y xiii Jornadas Latinoamericanas de Farmacotoxicología*. Buenos Aires. Argentina.
- Ardelli, B.F., Guerriero, S.B., Prichard, R.K., 2006. Characterization of a half-size ATP-binding cassette transporter gene which may be a useful marker for ivermectin selection in *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145(1): 94-100. ·
- Ardelli, B.F., Guerriero, S.B., Prichard, R.K., 2005. Genomic organization and effects of ivermectin selection on *Onchocerca volvulus* P-glycoprotein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 143(1): 58-66. ·
- Ardelli, B.F., Guerriero, S.B., Prichard, R.K., 2006. Ivermectin imposes selection pressure on P-glycoprotein from *Onchocerca volvulus*: Linkage disequilibrium and genotype diversity. *Parasitology*, 132 (3): 375-86. ·
- Ardelli, B.F., Stitt, L.E., Tompkins, J.B., Prichard, R.K., 2009. A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Veterinary Parasitology*, 165 (1-2): 96-108. ·
- Ardelli, B.F., y Prichard, R.K., 2013. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 191 (3-4): 264-275.
- Baggot, J., 1995. Pharmacokinetics: disposition and fate of drugs in the body. En: Adams, H.R. Eds. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 7° Edición, Iowa State University Press, Ames, pp 18-52.*
- Baggot, J.D., y Mc Kellar, Q.A., 1994. The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 17 (6): 409-19.
- Ballent M., Lifschitz, A., Virkel, G., Lanusse, C., 2005. Implicancias fisio-farmacológicas de la glicoproteína P en animales domésticos. *Analecta Veterinaria*, 25 (2): 36-47.

- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C., 2006. Modulation of the P-glycoprotein mediated intestinal secretion of ivermectin: *in vitro* and *in vivo* assessments. *Drug Metabolism and Disposition*, 34 (3): 457-63.
- 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. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30 (3): 242-8.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Lanusse, C., 2012. *In vivo* and *ex vivo* assessment of the interaction between ivermectin and danofloxacin in sheep. *Veterinary Journal*, 192 (3): 422-7.
- Barber S., Bowles, V., Lespine, A., Alvinerie, M., 2003. The comparative serum disposition kinetics of subcutaneous administration of doramectin, ivermectin and moxidectin in the Australian Merino sheep. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26 (5): 343-8.
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Stein P.A., Le Jambre L.F., Lenane I.J., 2001. Selection of different genotype larvae and adult worms for anthelmintic resistance by persistent and short-acting avermectin/milbemycins. *International Journal for Parasitology*, 31: 720-7.
- Barrère, V., Álvarez, L., Suárez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., Prichard, R.K., 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 186 (3-4): 344-9.
- Barrère, V., Keller, K., von Samson-Himmelstjerna, G., Prichard, R.K., 2013. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. *Parasitology International*, 62(5): 464-470.
- Bartley, D.J., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Ménez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., Lespine, A., 2009. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 136 (9): 1081-8.

- Bartley, D.J., Morrison, A.A., Dupuy, J., Bartley, Y., Sutra, J.F., Ménez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., Devin, L., Lespine, A., 2012. Influence of Pluronic 85 and ketoconazole on disposition and efficacy of ivermectin in sheep infected with a multiple resistant *Haemonchus contortus* isolate. *Veterinary Parasitology*, 187 (3-4): 464-472.
- Barton, N.H., 1983. Multilocus Clines. *Evolution*, 37(3): 454-71.
- Bassissi, M.F., Alvinerie, M., Lespine, A., 2004. Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. *Comparative Biochemistry and Physiology* 138 (4), 437-44.
- Benz, G.W., Roncalli, R.A., y Gross, S.J., 1989. Use of ivermectin in cattle, sheep, goats and swine. En: Campbell, W.C. (Ed.), *Ivermectin and Abamectin*. Springer, New York, pp. 215–229.
- Blackhall, W.J., Liu, H.Y., Xu, M., Prichard, R.K., Beech, R.N., 1998. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 95 (2): 193-201.
- Blackhall, W.J.; Pouliot, J.F.; Prichard, R.K.; Beech, R.N. 1998. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Experimental Parasitology*, 90 (1): 42-8.
- Blackhall, W.J., Prichard, R.K., y Beech, R.N., 2003. Selection at a γ -aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131(2): 137-45.
- Blackhall, W.J., Prichard, R.K., y Beech, R.N., 2008 P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Veterinary Parasitology*, 152 (1-2): 101-10.
- Bogan, J., y Mckellar, Q., 1988. The pharmacodynamics of ivermectin in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 11 (3): 260-8.

- Borgsteede, F., 1993. The efficacy and persistent anthelmintic effect of ivermectin in sheep. *Veterinary Parasitology*, 50 (1-2): 117-24.
- Bottjer, K.P., Klesius, P. H., y Bone, L. W., 1985. Effects of host serum on feeding by *Trichostrongylus colubriformis* (nematoda). *Parasite Immunology*, 7 (1): 1-9.
- Campbell, W., 1989. *Ivermectin and Abamectin*. Merck Institute for Therapeutic Research Rahway USA 978-1-4612-8184-9.
- Cantón, C., Ceballos, L., Moreno, L., Fiel, C., Domínguez, P., Bernat, G., Lanusse, C., Álvarez, L., 2015. Evaluation of IVM oral and injectable formulations against susceptible and resistant gastrointestinal nematodos in cattle. En: *Proceedings of the 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Liverpool, UK.
- Caracostantogolo, J., Castaño, R., Cutullé, Ch., Cetrá, B., Lamberti, R., Olaechea F., Ruiz, M., Schapiro, J., Martinez, M., Balbiani, G. y Castro, M., 2005. Evaluación de la resistencia a los antihelmínticos en rumiantes en Argentina. Roma, FAO. Estudio: *Resistencia a los antiparasitarios internos en Argentina*, pp 7-34.
- Castells, D., Nari, A., Rizzo, E., Marmol, E. and Acosta, D., 1995. Efecto de los nematodos gastrointestinales sobre diversos parámetros productivos del ovino en la etapa de recría. *Producción ovina*, 8: 17-31
- Chiu, S.H. y Lu, Y.H., 1989. *Metabolism and tissue residues*. En: *Ivermectin and abamectin*. Capítulo 8. Ed. por William Campbell pp 131-43.
- Chiu, S.H., Green, M.L., Baylis, F.P., Eline, D., Rosegay, A., Meriwether, H., Jacob, T., 1990. Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep, and rat. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry*, 38 (11): 2072-8.
- Chiu, S.H., Sestokas, E., Taub, R., Buhs, R.P., Green, M., Sestokas, R., Vandenheuvel, W. J., Arison, B.H., Jacob T. A., 1986. Metabolic disposition of ivermectin in tissues of cattle, sheep, and rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 14 (5): 590-600.

- Coles, G., y Roush R., 1992. Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 130 (23): 505-10.
- Coles, G.C. 2005. Anthelmintic resistance-looking to the future: a UK perspective. *Research Veterinary Science*, 78 (2): 99-108.
- Coles, G.C., Bauer, F.H.M., Borgsteede, S., Geerst, T.R., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44:35–44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136 (3-4):167–85.
- Craig, T.M., Hatfield, T.A., Pankavich, J.A., Wang, G.T., 1992. Efficacy of moxidectin against an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 41(3–4): 329-33.
- Cross, H., Renz, A., Trees, A., 1998. *In vitro* uptake of ivermectin by adult male *Onchocerca ochengi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 92 (6): 711-20.
- Crump, A., Otaguro, K., 2005. Satoshi Omura: in pursuit of nature's bounty. *Trends of Parasitology*, 21 (3): 126-32.
- De Montigny, P., Shim, J.S., Pivnichny, J.V., 1990. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent. *Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis*, 8 (6): 507-11.
- Demeler, J., Gill, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N., 2013a. The *in vitro* assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. *International Journal of Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 3:109-18.

- Demeler, J., Krücken, J., AlGusbi, S., Ramünke, S., De Graef, J., Kerboeuf, D., Geldhof, P., Pomroy, W.E., von Samson-Himmelstjerna, G., 2013. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 188 (1): 10-19.
- Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzike, A., Varady, M., Kenyong, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruysse, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2010a. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology*, 174 (1-2): 58-64.
- Demeler, J., Küttler, U., von Samson-Himmelstjerna, G., 2010b. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*, 170 (1-2): 61-70.
- Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G., y Sangster, N., 2014. Measuring the effect of avermectins and milbemycins on somatic muscle contraction of adult *Haemonchus contortus* and on motility of *Ostertagia circumcincta in vitro*. *Parasitology*, 141 (7): 948-56.
- Dent, J.A., Smith, M.M., Vasilatis, D.K., Avery, L., 2000. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)* 97 (6): 2674-9.
- Dent, L.A., Daly, C., Geddes, A., Cormie, J., Finlay, D.A., Bignold, L., Hagan, P., Parkhouse, R.M., Garate, T., Parsons, J., Mayrhofer G., 1997. Immune responses of IL-5 transgenic mice to parasites and aeroallergens. *Memoirs of the Institute of Oswaldo Cruz*, 92 (2): 45-54.
- Didier, A.D., y Loor, F. The abamectin derivate ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor, 1996. *Anticancer Drugs*, 7 (7): 745-51.
- Dolinská M., Königová, A., Letková, V., Molnár, L., Várady, M., 2013. Detection of ivermectin resistance by a larval development test-Back to the past or a step forward? *Veterinary Parasitology*, 198 (1-2): 154-158.

- Douch, P.G.C, y Morum P.E., 1994. The effects of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 24 (3): 321-26.
- Eddi, C., Caracostantogolo, J., Peña, M., Schapiro, J., Marangunich, L., Waller, P.J., Hansen, J.W., 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Argentina. *Veterinary Parasitology*, 62 (3-4): 189-97.
- El-Abdellati, A., De Graef, J., Van Zeveren, A., Donnan, A., Skuce, P., Walsh, T., Wolstenholmed, A., Tait, A., Vercruysee, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2011. Altered avr-14B gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *International Journal for Parasitology*, 41 (9): 951-57.
- Entrocasso, C., 1988a. Epidemiology and control of bovine Ostertagiasis in South America. *Veterinary Parasitology*, 27 (1-2): 59-65.
- Entrocasso, C., 1988b. Resistencia parasitaria al Oxfendazole en ovinos en un establecimiento en la provincia de Buenos Aires. En: *Memoria del VI Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias*. Buenos Aires, Agosto.
- Entrocasso, C., 2006. Comunicación Personal.
- Entrocasso, C., Alvarez, L., Manazza, J., Lifschitz, A., Borda, B., Virkel, G., Mottier, L., Lanusse, C., 2008. Clinical efficacy assessment of the albendazole–ivermectin combination in lambs parasitized with resistant nematodes. *Veterinary Parasitology*, 155 (3-4): 249-56.
- Fardel, O., Lecreur, V., Guillouzo, A., 1996. The P-glycoprotein multidrug transporter. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27 (8): 1283-91.
- Fazio, L.E., Streitenberger, N., Galvan, W.R., Sánchez, R.O., Gimeno, E.J., Sanabria, R.E., 2016. Efficacy and productive performance of moxidectin in feedlot calves infected with nematodes resistant to ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 22 (3): 26-9.
- Fiel, C., Fernandez, S., Dominguez, A., Saumell, C., 1991. Variación estacional del parasitismo interno en borregas Corriedale del Partido de Tandil (Pcia. de Bs. As., Argentina). Su efecto

en producción. X Congreso Latinoamericano de Parasitología y I Congreso Uruguayo de Parasitología. Montevideo, Uruguay.

Fiel, C., Steffan, P., 1994. Epidemiología de los nematodos gastrointestinales en la Pampa Húmeda. En: Nari, A.; Fiel, C. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos*.

Fiel, C. A., Steffan, P.E., Ferreyra, D.A., 1998. *Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes. 1ra edición. Ed. Pfizer ISBN 978-987-33-1502-2*.

Fiel, C. y Nari, A., 2013. *Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay, Ed. Hemisferio Sur. Pp 3-173*.

Fisher, M.H., y Mrozik, H., 1992. The Chemistry and Pharmacology of Avermectins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32: 537-53.

Gayrard, V., Alvinerie, M., Toutain, L., 1999. Comparison of pharmacokinetic profiles of doramectin and ivermectin pour-on formulations in cattle. *Veterinary Parasitology*, 81 (1): 47-55.

Geary, T., Sims, S., Thomas, E., Vanover, D., Davies, J., Winterrowd, CH., Klein, R., Ho, N., Thompson D., 1993. *Haemonchus contortus*: Ivermectin induces paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology*, 77(1): 88-96.

Geary, T.G., 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in Parasitology*, 21 (11):530-2.

Geyer, J., Will, O. y Petzinger, E., 2009. Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1 a,b* p- glycoprotein and *bcrp*-deficient knockout mice. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32 (1): 87-96.

Gibaldi, M. y Perrier, D., 1982. *Pharmacokinetics*. Ed Marcel Dekker, Inc., New York. 2nd edition pp. 45–109.

- Gill, J.H., Lacey, E., 1993. *In vitro* activity of paraherquamide against the free-living stages of *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta*. *International Journal of Parasitology*, 23 (3): 375-81.
- Gill, J.H., Redwin, J.M., van Wyk, J.A., Lacey, E., 1991. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *International Journal of Parasitology*, 21 (7): 771-76.
- Gill, J.H., y Lacey, E., 1998. Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *International Journal of Parasitology*, 28 (6): 863-77.
- Gopal, R.M., West, D.M., Pomroy, W.E., 2001. The difference in efficacy of ivermectin oral, moxidectin oral and moxidectin injectable formulations against an ivermectin-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 49 (4): 133-37.
- Graphpad Instat®, Version 3.0 for Windows 95 .GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA ; www.graphpad.com.
- Graphpad Software. 1998 Instat guide to choosing and interpreting statistical test. GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA; www.graphpad.com.
- Grimshaw, W.T.R., Hong, C., y Hunt, K.R., 1996. Potential for misinterpretation of the faecal egg count reduction test for levamisole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology* 62 (3-4): 267-73.
- Guzmán, M., Steffan, P., Riva, E., Bernat, G., Scarcella, S., Murno, G., Giudici, C., Rodriguez, E., Fiel, C., 2017. Experimental Infections in Cattle and Sheep with *Haemonchus contortus* Resistant or Susceptible to Benzimidazole Treatments. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 4 (3): 1074-78.
- Hennessy, D.R., 1997. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*, 72 (3-4): 367-90.

- Hennessy, D.R., 2000. WAAVP/Pfizer Award for Excellence in Veterinary Parasitology Research. My involvement in, and some thoughts for livestock parasitological research in Australia. *Veterinary Parasitology*, 88 (1-2): 107–16.
- Henriksen, S.A., Korsholm, H.A., 1983. Method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. *Nordisk Veterinaer Medicin*, 35 (11): 429-30.
- Hibbs, R.E., y Gouaux, E., 2011. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, 474 (7349): 54–60.
- Holford, N.H., y Sheiner, L.B., 1981. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clinical Pharmacokinetics*, 6 (6): 429-53.
- Huang, Y.J., y Prichard, R.K., 1999. Identification and stage-specific expression of two putative P-glycoprotein coding genes in *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 102 (2): 273-81.
- Hughes T, Andrews B, y Boone C., 2004. Old drugs, new tricks: using genetically sensitized yeast to reveal drug targets. *Cell*, 116 (1): 5-7.
- Imperiale, F., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Virkel, G., Lanusse, C., 2004. Comparative depletion of ivermectin and moxidectin milk residues in dairy sheep after oral and subcutaneous administration. *Journal of Dairy Research*, 71 (4): 427-33.
- Jackson, F., y Coop, R., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, 120 (7): 95-107.
- Jacquiet, P., Cabaret, J., Cheikh, D., 1996. Identification of *Haemonchus* species in domestic ruminants based on morphometrics of spicules. *Parasitology Research* 83 (1): 82-6.
- James, C.E., y Davey, M.W., 2008. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*, 39 (2): 213-20.

- Jones, P.M., y George, A.M., 2005. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modeling. *International Journal for Parasitology*, 35 (5): 555-66.
- Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, 20 (10): 477-81.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., Howell, S.B., Neiss, J.M., Williamson, L.H., Terrill, T.H., 2007. A novel approach for combining the use of in vitro and in vivo data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. *International Journal for Parasitology*, 37 (7): 795-804.
- Kaplan, R.M., y Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186 (1-2): 70-8.
- Kerboeuf D., Guégnard, F., y 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. *Parasitology Research*, 88 (9): 816-21.
- Kerboeuf D., Guégnard, F., y Vern, Y.L., 2003. Detection of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance against anthelmintics in *Haemonchus contortus* using anti-human *mdr1* monoclonal antibodies. *Parasitology Research*, 91 (1): 79-85.
- Kohler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal of Parasitology*, 31 (4): 336-45.
- Kotze A.C., Le Jambre L.F., O'Grady J., 2006. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. *Veterinary Parasitology*, 137 (3-4): 294-305.
- Kotze, A.C., Cowling, K., Bagnall, N.H., Hines, B.M., Ruffell, A.P., Hunt, P.W., Coleman, G.T., 2012. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3 (2): 92-7.

- Kotze, A.C., y Bagnall, N.H., 2006. RNA interference in *Haemonchus contortus*: Suppression of beta-tubulin gene expression in L3, L4 and adult worms *in vitro*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145 (1): 101-10.
- Kwa, M.S.G., Okoli, M.N., Schulz-Key, H., Okongkwo, P.O., Roos, M.H., 1998. Use of P-glycoprotein gene probes to investigate anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* and comparison with *Onchocerca volvulus*. *International Journal for Parasitology*, 28 (8): 1235-40.
- Laffont C.M., Toutain P.L., Alvinerie M., Bousquet-Melou A., 2002. Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 30 (6): 626–30.
- Lanusse, C.E., y Prichard, R.K., 1993. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metabolism Review*, 25 (3): 235-79.
- Lanusse, C., Lifschitz, A., Virkel, G., Álvarez, L.; Sanchez, S.; Sutra, J.F.; Galtier, P.; Alvinerie, M. 1997. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20 (2): 91-9.
- Lanusse, C.; Álvarez, L.; Lifschitz, A.; Suárez, G., 2013. Bases farmacológicas de la terapéutica antihelmíntica. En: *Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes*. Fiel, C. y Nari A. *Editorial Hemisferio Sur, SRL (Uruguay)*, pp 223-53.
- Lanusse, C., Lifschitz, A., Álvarez, L., 2015. Basic and clinical pharmacology contribution to extend anthelminticmolecules lifespan. *Veterinary Parasitology*, 212 (1-2): 35-46.
- Lapage, G., 1962. *Veterinary Helminthology and Entomology*. The Williams and Wilkins company. Baltimore. 5th Edition. pp. 212-60.
- Lavebratt, C., Sengul, S., Jansson, M., Schall, M., 2004. PyrosequencingTM-based SNP allele frequency estimation in DNA pools. *Human Mutation Variation, informatics and disease*, 23 (1): 92-7.

- Le Jambre, L.F., Geoghegan, J., Lyndal-Murphy, M., 2005. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 128 (1–2): 83-90.
- Le Jambre, L.F., Gill, J.H, Lenane, I.J., Lacey, E., 1995. Characterisation of an avermectin resistant strain of Australian *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 25 (6): 691-8.
- Le Jambre, L.F., Lenane, I.J., Wardrop, A.J., 1999. A hybridisation technique to identify anthelmintic resistance genes in *Haemonchus*. *International Journal of Parasitology*, 29 (12): 1979-85.
- Leathwick, D.M., 2012. Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in combination. *Veterinary Parasitology*, 186 (1-2): 93-100.
- Leathwick, D.M., y Hosking, B.C., 2009. Managing anthelmintic resistance: modelling strategic use of a new anthelmintic class to slow the development of resistance to existing classes. *New Zealand Veterinary Journal*, 57 (4): 203-7.
- Leathwick, D.M., y Miller C.M., 2013. Efficacy of oral, injectable and pour-on formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, 191 (3-4): 293-300.
- Lespine, A., Sutra, J.F., Dupuy, J., Alvinerie, M., Aumon, M., 2004. The influence of parasitism on the pharmacokinetics of moxidectin in lambs. *Parasitology Research*, 93 (2) : 121–6.
- Lespine, A., Alvinerie, M., Vercruyssen, J., Prichard, R.K., Geldhof, P., 2008. ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 24 (7): 293-8.
- Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orłowski, S., Alvinerie, M., 2007. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure–affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30 (1): 84-9.

- Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C., Prichard, R., 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2: 58-7.
- Lifschitz, A., 2000a. *Cinética plasmática y distribución tisular de fármacos endectocidas en bovinos*. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencia Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Centro de la Provincia de Buenos Aires. pp 192.
- Lifschitz, A., Ballent, M., Virkel, G., Sallovitz, J., Viviani, P., Lanusse, C., 2014. Accumulation of monepantel and its sulphone derivative in tissues of nematode location in sheep: pharmacokinetic support to its excellent nematocidal activity. *Veterinary Parasitology*, 203 (1-2): 120-6
- Lifschitz, A., Entrocasso, C., Álvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, J., Virkel, G., Borda, B., Lanusse, C., 2010a. Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Journal of Veterinary Parasitology*, 172 (3-4): 291-8.
- Lifschitz, A., Murno, G., Pis, A., Sallovitz, J., Virkel, G., Lanusse, C., 1997. Malnutrition modifies the disposition kinetics of ivermectin in calves. *Proceedings at the 7th European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*, pp. 102-103.
- Lifschitz, A., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Jauregui Lorda, J., Lanusse, C., 2004. Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. *Veterinary Parasitology*, 119 (2-3): 247-57.
- Lifschitz, A., Suarez, V.H. Sallovitz, J., Cristel, S.L., Imperiale, F., Ahoussou, S., Schiavi, C., Lanusse, C., 2010b. Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. *Experimental Parasitology*, 125 (2): 172-8

- Lifschitz A, Virkel G, Ballent M, Sallovitz J, Pis A, Lanusse C., 2005. Moxidectin and ivermectin metabolic stability in sheep ruminal and abomasal contents. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28 (5): 411-8.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Imperiale, F., Sutra, J.F., Galtier, P., Lanusse, C.; Alvinerie, M., 1999. Moxidectin in cattle: correlation between plasma and target tissues disposition kinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22 (4): 266-73.
- Lifschitz A.; Virkel, G.; Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Lanusse, C., 2002. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 25 (2): 111–20.
- Lifschitz, A.; Virkel, G.; Sallovitz, J.; Sutra, J.F.; Galtier, P.; Alvinerie, M., Lanusse, C., 2000b. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to tissues of parasite location in cattle. *Veterinary Parasitology*, 87 (4): 327-38.
- Lin J.H., 2003. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Advances in Drug Delivery Review*, 55 (1): 53-81.
- Lincke, C.R., Broeks, A., The, I., Plasterk, R.H., Borst, P., 1993. The expression of two P-glycoprotein (pgp) genes in transgenic *Caenorhabditis elegans* is confined to intestinal cells. *EMBO Journal* 12 (4): 1615-20.
- Ling, V., y Thompson, L.H., 1974. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *Journal of Cellular physiology*, 83 (1): 103-16.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25 (4): 402-8.
- Love, S., 2003. Treatment and prevention of intestinal parasite-associated disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 19 (3): 791-806.
- Luque, S.E., 2013; Detección de Resistencia Antihelmíntica en nematodos Gastrointestinales de ovinos mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*. Tesis de grado, Licenciatura en Ciencias

Biológicas Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Marriner, S.E., McKinnon, I., y Bogan, J.A., 1987. The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10 (2): 175-9.

Martin, P.J., Anderson, N., Jarrett, R.G., 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Veterinary Journal*, 66 (8): 236-40.

Martin, R., 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*. 154 (1): 11-34.

Martínez, O. M. C., 2010. Mecanismo de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nemátodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Université de Toulouse, Francia.

McCavera, S., Walsh, T.K., Wolstenholme, A.J., 2007. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. *Parasitology*, 134 (8): 1111-21.

McKellar, Q., Jackson, F., Coop, R.L., Jackson, E., Scott, E., 1991. Effect of parasitism with *Nematodirus battus* on the pharmacokinetics of levamisole, ivermectin and netobimin. *Veterinary Parasitology*, 39 (1-2): 123-36.

McKellar, Q., y Benchaoui, H., 1996. Avermectins and milbemycins. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19 (5): 331-51.

McKellar, Q., y Jackson, F., 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in Parasitology*, 20 (10): 456-61.

McKellar, Q.A., y Marriner, .E., 1987. Comparison of the anthelmintic efficacy of oxfendazole or ivermectin administered orally and ivermectin administered subcutaneously to sheep during the periparturient period. *The Veterinary Record*, 120 (16): 383-86.

- McKenna, P.B., 1990. The detection of anthelmintic resistance by the faecal egg count reduction test: an examination of some of the factors affecting performance and interpretation. *New Zealand Veterinary Journal*, 38 (4): 142-7.
- Mealey, K.L., 2004. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27 (5): 257-64.
- Ménez, C., Mselli-Lakhala, L., Foucaud-Vignault, M., Balaguer, P., Alvinerie, M., Lespine, A., 2012. Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. *Biochemical Pharmacology*, 83 (2): 269-78.
- Molento, M.B., 2009. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Veterinary Parasitology*, 163 (3): 229-34.
- Molento, M.B., Tasca, C., Gallo, A., Ferreira, M., Bonont, R., Stecca, E., 2004. Método FAMACHA© como parámetro clínico individual de infección por *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes. *Ciência Rural*, 34 (4): 1139-45.
- Molento, M.B., y Prichard, R.K., 1999. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitology Research*, 85 (12): 1007-11.
- Mottier, L., Álvarez, L., Ceballos, L., Lanusse, C., 2006. Drug transport mechanisms in helminth parasites: passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Experimental Parasitology*, 113 (1): 49-57.
- Nari, A.; Fiel, C., 1994. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay, Ed. Hemisferio Sur. pp 519.
- Niec, R., 1968. Cultivo e identificación de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. *Manual técnico No. 3*, INTA, Bs. As., Argentina. pp. 32.

- Njue, A., Hayashi, J., Kinne, L., Peng Feng, X., Prichard, R.K., 2004. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *Journal of Neurochemistry*, 89 (5): 1137-47.
- Pérez, R., Palma, C., Cabezas, I., Araneda, M., Rubilar, L., Alvinerie, M., 2006. Effect of parasitism on the pharmacokinetic disposition of ivermectin in lambs. *Journal of Veterinary Medicine: A Physiology Pathology and Clinical Medicine*. 53 (1): 43-8.
- Portillo, V., Jagannathan, S., y Wolstenholme, A.J., 2003. Distribution of glutamate-gated chloride channel subunits in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Comparative Neurology*, 462 2): 213-22.
- Presidente, P.J.A., 1985. Methods for the detection of resistance to anthelmintics. En: *Resistance in nematodes to Anthelmintic Drugs*. Eds. Anderson, N., Waller, P.J. (Eds). Division of Animal Health, CSIRO, Australia. pp 13-27.
- Prichard, R., 1994. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54 (1-3): 259-68.
- Prichard, R., Mènez, C., Lespine, A., 2012. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2:134-153.
- Prichard, R.K., 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 17 (9): 445-53.
- Prichard, R.K., 2007. Ivermectin resistance and overview of the consortium for anthelmintic resistance SNPs. Expert Opinion. *Drug Discovery*. 2 (1): 41-52.
- Prichard, R.K., y Roulet, A., 2007. ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, 134 (8): 1123-32.
- Quiroz, H., 1984. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Capítulo 2. pp 26-41. Ed. LIMUSA, México.

- Ranjan, S., Wang, G.T., Hirschlein, C., Simkins, K.L., 2002. Selection for resistance to macrocyclic lactones by *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 103 (1-2): 109–17.
- Raza, A., Kopp, S.R., Jabbar, A., Kotze, A.C., 2015. Effects of third generation P-glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and -susceptible isolates of *Haemonchus contortus* to anthelmintics *in vitro*. *Veterinary Parasitology*, 211 (1-2): 80-8.
- Raza, A., Kopp, S.R., Kotze, A.C., 2016. Synergism between ivermectin and the tyrosine kinase/P-glycoprotein inhibitor crizotinib against *Haemonchus contortus* larvae *in vitro*. *Veterinary Parasitology*, 227 (1): 64-8.
- Richards, C., Behnke, J.M. y Duce, I.R., 1995. *In Vivo* Studies on the Relative Sensitivity to Ivermectin of *Necator americanus* and *Ancylostoma ceylanicum*. *International Journal for Parasitology*, 25 (10): 1185-91.
- Roberts, F., O’Sullivan, P., 1949. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1 (1): 99-103.
- Rohrer, S.P., Evans, D., Bergstrom E.A., 1990. A membrane associated glutamate binding protein from *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 95 (2): 223-28.
- Romero, J.T., Espinosa, G., Valera, A.R., 1992. Demostración de resistencia al oxfendazole en Trichostrongylidos de ovinos de la zona deprimida del salado. *Revista de Medicina Veterinaria*, 73: 82-86.
- Romero, J.R., Anziani, O.S., Cetra, B., Fiel, C.A., 2013. Epidemiología e impacto productivo de nematodos gastrointestinales en la región NEA. En: Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. Fiel C y Nari A. Ed: Agropecuaria HemisferioSur SRL. Uruguay. pp 89-112.

- Romero J.R., 2007. *Enfermedades parasitarias de los ovinos y rumiantes menores en el cono sur de América*. Eds, INTA, 70, EEA-INTA Anguil, Argentina, (ISSN 0325-2132), 298 pp.
- Romero, J.R., Boero, C.A., 2001. Epidemiología de las gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la Argentina. *Analecta Veterinaria*, 21 (1): 21-37.
- Rothwell, J.T., y Sangster, N.E., 1993. An *in vitro* assay utilizing parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. *International Journal of Parasitology*, 23 (5): 573-8.
- Sánchez, R.O., Romero, J.R., 2005. Observaciones sobre la dinámica del parasitismo gastrointestinal en corderos de destete de la Pampa Húmeda. *Revista de Medicina Veterinaria*, 86 (1): 17-26.
- Sangster, N.C. y Gill, J., 1999. Pharmacology of Anthelmintic Resistance *Parasitology Today*, 15 (4): 141-6.
- Sangster, N.C., 1994. P-glycoproteins in nematodes. *Parasitology Today*, 10 (8): 319-22.
- Sangster, N.C., 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal of Parasitology*, 29 (1): 115-24.
- Sangster, N.C., Davis, C.W, y Collins, G.H., 1991. Effects of cholinergic drugs on longitudinal contraction in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 21(6): 689-95.
- Saumell, C., Lifschitz, A., Baroni, R., Fusé, L., Bistoletti, M., Sagües, F., Bruno, S., Alvarez, G., Lanusse, C., Alvarez, L., 2017. The route of administration drastically affects ivermectin activity against small strongyles in horses. *Veterinary Parasitology*, 236 (1): 62-7.
- Scott, E. W., y McKellar, Q. A, 1992. The distribution and some pharmacokinetic parameters of ivermectin in pigs. *Veterinary Research Communications*, 16 (2): 139-46.

- Scott, W., Kinabo, L.D., McKellar, Q.A., 1990. Pharmacokinetics of ivermectin after oral or percutaneous administration to adult milking goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 3 (4): 432-35.
- Sheriff J. C., Kotze, A.C., Sangster, N.C., Martin, R.J., 2002. Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on feeding and pharyngeal pumping in *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Parasitology*, 125 (5): 477-84.
- Sheriff, J.C., Kotze, A.C., Sangster, N., Desmond, C., Hennessy, R., 2005. Effect of ivermectin on feeding by *Haemonchus contortus* *in vivo*. *Veterinary Parasitology*, 128 (3-4): 341-6.
- Shoop, W.L., Haines, H.W., Michael, B.F., Eary, C.H., 1993. Mutual resistance to avermectins and milbemycins: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. *The Veterinary Record*, 133 (18): 445-7.
- Shoop, W.L., Mrozik, H., Fisher, M.H., 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, 59 (2): 139-56.
- Silvestre, A., y Humbert, J.F., 2000. A Molecular Tool for Species Identification and Benzimidazole Resistance Diagnosis in Larval Communities of Small Ruminant Parasites. *Experimental Parasitology*, 95 (4): 271-6.
- Skerman, K.D., y Hillard J.J., 1966. *A handbook for studies of helminth parasites of ruminants*. Ed. Near East Animal Health Institutes, Iran Unit, United Nations Development Programme, Special Fund, pp. 200.
- Smith, H., y Campbell, W.C., 1996. Effect of ivermectin on *Caenorhabditis elegans* larvae previously exposed to alcoholic immobilization. *Journal of Parasitology*, 82 (1): 187-8.
- Soulsby, E.J.L., 1988. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. 7^o Edición. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. pp 136-54.
- Soulsby, E.J.L., 2007. New concepts in strongyle control and anthelmintic resistance: The role of refugia. *The Veterinary Journal*, 174 (1): 6-7.

- Stubbings, L.A., 2003. Internal parasite control in sheep. En: Proceedings of a Workshop, *Short Term Strategies to Slow the development of Anthelmintic Resistance in Internal Parasites of Sheep in the United Kingdom*, UK.
- Suárez, G., Álvarez, L., Castells, D., Correa, O., Fagiolino, P., Lanusse, C., 2013. Relative bioavailability and comparative clinicaefficacy of different ivermectin oral formulations in lambs. *BMC Veterinary Research*, 9: 27-34.
- Suárez, V., Olaechea, F., Romero, J., Rossanigo, C., 2007. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. Publicación Técnica N° 70. Ediciones INTA. pp 8-32.
- Sutherland I y Scott I, 2010. *Gastrointestinal nematodes of Sheep and Cattle: Biology and Control*. Eds. Wiley Blackwell. West Sussex, UK. pp 242.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L., 2007. *Veterinary Parasitology*, Eds. Willey and Blackwell Publishing, Ames, 3° Edition. pp. 600.
- Taylor, M.A., Hunt, K.R., Goodyear, K.L., 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103 (3): 183-94.
- Vokral, I., Bartikova, H., Prchal, L., Stuchlikova, L., 2012. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*, 139 (10): 1309-16.
- Thomaz Soccol, V., Souza, F.P., Sotomaior, C., Castro, E.A., Milczewski, V., 2004. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (1): 41-7.
- Toutain, P.L., y Bousquet-Melou, A., 2004. Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27 (6): 455-66.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Jennings, F.W., Dunn, A.M., 1996. *Veterinary Parasitology*, 2nd edition. Eds. Longman Higher Education, UK. Pp 307.

- Van Zeveren, A., 2009 *Ivermectin resistance in the bovine nematode Ostertagia Ostertagi*. PhD Thesis. Universiteit Gent, Belgium.
- Várady, M., Petersen, M.B., Bjorn, H., Nansen, P., 1996. The efficacy of ivermectin against nodular worms of pigs: the response to treatment using three different dose levels against *Oesophagostomum dentatum* and *Oesophagostomum quadrispinulatum*. *International Journal for Parasitology*, 26, 369-374.
- Vercruysse, J., y Rew, R.S., 2002. *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy* (eds) Published by CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK (2002) pp 432.
- Vickers M., Venning M., McKenna P.B., Mariadass B., 2001. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 49 (3):101-5.
- Von Samson-Himmelsjerna, G., 2006. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 136 (2): 99-107.
- Von Samson-Himmelsjerna, G., y Blackhall, W., 2005. Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths? *Veterinary Parasitology*, 132 (3–4): 223-39.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, C., Jackson, F., Bauer, C., Borgsteede, F., Cirak, V.Y., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky, R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research*, 105 (3): 825-34.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Walsh, T.K., Donnan, A.A., Carrière, S., Jackson, F., Skuce, P.J., Rohn, K., y Wolstenholme, A.J., 2009. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology Research*, 136 (3): 349-58.

- Williamson S.M., Wolstenholme A.J., 2012. P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *Journal of Helminthology*, 86 (2): 202-8.
- Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K., Kaplan, R., Wolstenholme, A.J., 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 180 (2): 99-105.
- Witty, M.J., 1999. Current strategies in the search for novel antiparasitic agents. *International Journal of Parasitology*, 29: 95-103.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N., 2004. Drug resistance in Veterinary Helminthes. *Trends in Parasitology*, 20 (10): 469-76.
- Wolstenholme, A.J., y Rogers, A.T., 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131: 85-95.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruyse, J., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 58 (3): 181-213.
- Wooster, M.J., Woodgate, R.B., Chick, B.F., 2001. Reduced efficacy of ivermectin, abamectin and moxidectin against field isolates of *Haemonchus contortus*. *Australian Veterinary Journal*, 79 (12): 840-2.
- 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. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 91 (2): 327-35.

Zulalian, J., Stout, S.J., daCunha, A.R., Garces, T., Miller, P., 1994. Absorption, Tissue Distribution, Metabolism, and Excretion of Moxidectin in Cattle. *Agricultural Food and Chemistry*, 42 (2): 381-7.