

**DOCTORADO EN CIENCIA
ANIMAL**

TESIS

***COMBINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS:
EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE SU IMPACTO
EN EL CONTROL PARASITARIO EN BOVINOS***

Por: Vet. CANDELA CANTÓN

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
U.N.C.P.B.A.



2018

DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL

TESIS

***COMBINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS:
EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE SU IMPACTO EN
EL CONTROL PARASITARIO EN BOVINOS***

Por: **Vet. CANDELA CANTÓN**

Director: **Prof. Luis Ignacio Alvarez**

Co-Director: **Dra. Laura Ceballos**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

U.N.C.P.B.A

Miembros del jurado:

Prof. Oscar S. Anziani

Prof. Gabriela Albarellos

Prof. Pedro E. Steffan

A Luli, mamá y papá

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por brindarme su apoyo incondicional durante todo el doctorado. Gracias papá, mamá y Luli por estar siempre presente, sin ustedes hubiera sido imposible lograrlo.

A mis directores Nacho Alvarez y Laura Ceballos por estar presente en todo momento, por su formación, su confianza, su ayuda en cada ensayo, su excelente predisposición cada vez que llegué con poco tiempo, por permitirme participar en un gran equipo de trabajo, pero especialmente de excelentes personas. Simplemente muchas muchas gracias Nacho y Lau!

A Carlos Lanusse por sus constantes aportes y consejos, por darme siempre nuevas posibilidades y especialmente por permitirme ser parte de este increíble equipo de trabajo que formamos en el Laboratorio de Farmacología.

A Paula Domínguez y Pablo Yaguez por su enorme ayuda en todos los ensayos a campo, por estar siempre a pesar de los ensayos a cualquier hora, con largos viajes, y horas y horas de HPG, pero sobretodo por los excelentes momentos compartidos en el campo.

A César Fiel y Giselle Bernat del Laboratorio de Parasitología por su concocimiento y por su gran colaboración en el diseño de los ensayos, en el análisis de los resultados y en el trabajo en el laboratorio.

A mis amigas incondicionales Cata y Mica por su amistad, compañía en todo momento, por nuestras charlas infinitas, por compartir los mejores momentos pero también estar en los malos, como decimos siempre sin ustedes no lo hubiera logrado.

A las “chicas lab”, Paula Viviani, Mariana Ballent, Laura Moreno y Laura Maté por su ayuda durante todo el doctorado, ya sea en el campo, en el laboratorio, en inglés, siempre colaborando desinteresadamente, y especialmente por los buenos momentos compartidos todos los días.

A todo el equipo de personas que forman el grupo de Farmacología, por su ayuda en diferentes situaciones, sus aportes de conocimiento, y especialmente por lograr un excelente ambiente de trabajo al que dan ganas de ir todos los días. Un gracias especial a Adrian Lifschitz y Germán Fonzo.

A todos los productores agropecuarios que me brindaron la posibilidad de realizar todos los ensayos en sus campos, y un gracias especial a papá que siempre estuvo presente para ayudarnos.

A los evaluadores de la presente Tesis por sus aportes para mejorar la interpretación de los resultados obtenidos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por la financiación del presente Doctorado.

A la comisión de Doctorado y a la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA por darme la posibilidad que poder realizar el Doctorado en mi querida facultad.

RESUMEN

La parasitosis gastrointestinal (GI) es una de las enfermedades que mayor impacto económico ocasiona en los sistemas pastoriles de producción de carne a nivel mundial, principalmente por afectar la ganancia de peso en los terneros de invernada. Por lo tanto, el control parasitario es necesario para asegurar buenos niveles productivos en dichos sistemas. El uso inadecuado de los antihelmínticos, entre otros factores, han llevado al escenario actual de resistencia a los principales antiparasitarios utilizados. Sin embargo, el uso de los mismos continúa siendo en la actualidad, una de las herramientas clave en el control parasitario ya que es la alternativa más práctica para su aplicación a campo. Por lo tanto, es imprescindible buscar nuevas estrategias para optimizar el uso de los antihelmínticos disponibles actualmente en el mercado, tanto para minimizar las probabilidades de una falla terapéutica en el contexto de resistencia parasitaria, como para retardar el desarrollo de la misma. En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue caracterizar desde un abordaje fármaco-parasitológico las ventajas/desventajas del uso combinado de fármacos antihelmínticos en bovinos parasitados con nematodos susceptibles/resistentes a los fármacos evaluados.

La presente Tesis Doctoral se dividió en dos Secciones Experimentales. En la Sección Experimental I (estudios *ex vivo*) se evaluaron las potenciales interacciones farmacodinámicas y/o farmacocinéticas a nivel parasitario entre ivermectina (IVM) y albendazole sulfóxido (ABZSO) utilizados solos o en forma combinada. Para llevar a cabo los estudios *ex vivo* se utilizó el parásito ovino *H. contortus* como modelo de nematodo, dado que el mismo es mantenido en condiciones de laboratorio y los aislamientos susceptibles y resistentes se encuentran caracterizados. Los estudios *ex vivo* permitieron concluir que la motilidad parasitaria no sería un parámetro lo suficientemente sensible y exacto para estudiar la actividad de diferentes fármacos, ya sea evaluar interacciones farmacodinámicas entre ellos, como diferenciar parásitos susceptibles de resistentes. Además, se encontró una menor acumulación de IVM y ABZSO en *H. contortus* resistente, lo cual podría deberse a limitaciones en la entrada/incremento del eflujo así como a un aumento en el metabolismo del fármaco.

En la Sección Experimental II (estudios *in vivo*) se evaluaron las posibles interacciones farmacodinámicas y/o farmacocinéticas que pueden ocurrir al co-administrar fármacos antiparasitarios (nematodicidas) de diferentes grupos químicos (combinaciones antihelmínticas) en bovinos. La combinación IVM+ricobendazole (RBZ) obtuvo un efecto terapéutico aditivo en bovinos bajo los diferentes escenarios naturales de campo evaluados en la presente Tesis Doctoral.

La combinación fue altamente efectiva en controlar *Haemonchus* spp. resistente a IVM (el tratamiento combinado fue el único en alcanzar una eficacia clínica de 100%), y *Cooperia* spp. resistente a IVM y a RBZ. Tras el uso de la combinación se observó la supervivencia de una menor cantidad de parásitos resistentes, lo que aumentaría la dilución con la población parasitaria en refugio, y por ende retrasaría el desarrollo de resistencia. Con respecto al estudio farmacocinético, los perfiles de concentraciones plasmáticas tanto para IVM como para RBZ no mostraron diferencias luego de su administración en forma única o combinada, lo que indica la ausencia de interacciones farmacocinéticas entre ambos antihelmínticos. Además, se evaluó la combinación RBZ+levamisole (LEV), la cual podría ser una combinación nematocida válida, dado que ambos antihelmínticos tienen una persistencia en plasma similar y no se observaron interacciones farmacocinéticas adversas luego del tratamiento combinado. Por otro lado, dicha combinación podría ser útil para retrasar el desarrollo de resistencia en un escenario de susceptibilidad. Esto se observó en forma particular en invierno, cuando la combinación alcanzó un 100% de eficacia total por lo que la selección de resistencia antihelmíntica nunca ocurriría.

Como una estrategia alternativa para optimizar el control parasitario también se evaluó el comportamiento farmacocinético y la eficacia clínica de IVM luego de su administración oral y subcutánea en bovinos. Se observó una mayor eficacia contra nematodos GI luego de la administración oral de IVM, en comparación al tratamiento SC. Sin embargo, la mejor eficacia relacionada a la vía de administración sólo fue observada en presencia de ciertos nematodos resistentes. Las mayores concentraciones de IVM alcanzadas a nivel GI (medidas como el fármaco excretado en materia fecal) después de la administración oral en comparación con la SC pueden haber representado una mayor exposición de los nematodos adultos al fármaco. Debido a esto, se debe considerar que la administración oral de IVM podría tener un impacto en la eficacia dependiendo del nivel de resistencia y de los géneros involucrados en la misma

Finalmente se evaluó, en un sistema real de producción bovina, el impacto de la resistencia antihelmíntica sobre la productividad de bovinos naturalmente parasitados con nematodos GI resistentes a lactonas macrocíclicas (IVM y moxidectin). La resistencia antihelmíntica tuvo un impacto negativo sobre la productividad de bovinos naturalmente parasitados con nematodos resistentes. La cantidad de kg de peso y u\$s perdidos por utilizar un antiparasitario ineficaz dependen del grado de desarrollo de la resistencia y de las condiciones particulares de cada sistema productivo (recurso forrajero, géneros parasitarios resistentes involucrados, implementación de monitoreo parasitológico, entre otros). Los resultados obtenidos en la Tesis

demuestran que las pérdidas productivas y económicas derivadas de un ineficaz control parasitario son de significativa importancia.

Los estudios fármaco-parasitológicos realizados en la presente Tesis Doctoral son necesarios para comprender las potenciales ventajas/desventajas de las diferentes alternativas de optimización del control parasitario en un contexto de resistencia antihelmíntica.

SUMMARY

Gastrointestinal (GI) parasitism is a major cause of economic losses in grazing systems of livestock throughout the world, mainly because it affects weight gain in calves. Therefore, parasite control is necessary to ensure adequate production levels in these systems. Inadequate drug uses, among other factors, have led to the current scenario of anthelmintic resistance. However, the use of anthelmintics continues to be one of the most important tools for parasite control, since it is the most practical alternative under field conditions. Therefore, it is essential to search for new strategies to optimize the use of anthelmintics currently available in the veterinary market, both to minimize the therapeutic failure in the context of anthelmintic resistance, and to delay the development of it. In this context, the principal aim of this Doctoral Thesis was to evaluate, from a pharmaco-parasitological approach, the advantages/disadvantages of the combined use of anthelmintic drugs in cattle naturally infected with susceptible/resistant nematodes.

The present Doctoral Thesis was divided into two Experimental Sections. In Experimental Section I (*ex vivo* studies) potential pharmacodynamics (PD) and/or pharmacokinetic (PK) interactions at parasite level were evaluated between ivermectin (IVM) and albendazole sulfoxide (ABZSO) used alone or in combination. To carry out the *ex vivo* studies, the *H. contortus* ovine parasite was used as a nematode model, given that it is kept under laboratory conditions and the susceptible and resistant isolates are characterized. The results of the *ex vivo* studies allowed to conclude that parasite motility is a poor parameter for evaluating PK interactions between anthelmintics and for detecting resistance in GI nematodes. In addition, a lower accumulation of IVM and ABZSO was found in resistant *H. contortus*, which could be due to limitations in the entry/increase of the efflux as well as to an increase in the metabolism of the drug.

In Experimental Section II (*in vivo* studies), the potential PD and/or PK interactions occurring after co-administration of two nematocidal anthelmintics from different chemical families (anthelmintic combinations) in cattle were evaluated. The IVM+ricobendazole (RBZ) combination had a therapeutic additive effect in cattle under the different natural field conditions evaluated in this Doctoral Thesis. In fact, the combination was highly effective at controlling the IVM-resistant *Haemonchus* spp. (the combined treatment was the only one that achieved 100% clinical efficacy). and *Cooperia* spp. resistant to IVM and RBZ. The combination leave fewer resistant genotype worms surviving treatment than a single active, and result in a consequently

greater diluting effect of the unselected portion of the population “in refugia”; and therefore delay the development of resistance. Regarding the PK study, the plasma concentration profiles for both IVM and RBZ did not show differences after their administration both alone and co-administered, indicating no PK interactions between both anthelmintics in calves. In addition, the RBZ+levamisole (LEV) combination was evaluated, which could be a valid nematocidal combination in cattle, since both anthelmintics have similar plasma persistence and no PK interactions were observed after their co-administration. The RBZ+LEV combination was the only treatment that achieved 100% clinical efficacy in winter. In this sense, a scenario where the nematode population is susceptible, the use of the combination could be useful to delay the development of resistance, because if an anthelmintic treatment reaches 100% of efficacy, like in the present study, selection of anthelmintic resistance will never occur.

As an alternative to optimize parasite control, the PK behavior and the clinical efficacy of IVM after oral and subcutaneous (SC) administration in cattle were also evaluated. Greater efficacy against GI nematodes was observed after oral administration of IVM, compared to SC treatment. However, the enhanced efficacy related to the route of administration was only observed in the presence of certain resistant nematodes. The highest concentrations of IVM reached at the GI level (measured as the drug excreted in faeces) after oral administration compared to SC may have represented an increased GI nematodes exposure to the drug. Thus, it should be considered that the oral administration of IVM could have an impact on the efficacy depending on the level of resistance and the involved nematode population.

Finally, the impact of anthelmintic resistance on the productivity of calves naturally infected with GI nematodes resistant to IVM and moxidectin (MXD) was evaluated in a commercial beef-cattle farm. Anthelmintic resistance had a high negative impact on productivity in calves naturally infected with resistant nematodes. The amount of kg and US\$ lost due to ineffective anthelmintic treatment depend on the degree of resistance development and the particular condition of each production system (forage resource, involved nematode population, implementation of parasitological monitoring, among others). The results obtained in the present Thesis show that the productive and economic losses due to ineffective parasite control are of significant importance.

The pharmaco-parasitological studies carried out in this Doctoral Thesis are necessary to understand the potential advantages/disadvantages of the different alternatives to optimize parasite control in a context of anthelmintic resistance.

PALABRAS CLAVE

Bovinos. Control parasitario. Resistencia antihelmíntica. Combinaciones de antihelmínticos. Interacciones Farmacológicas. Impacto productivo. Ivermectina. Ricobendazole. Levamisole.

ABREVIATURAS

ABC: área bajo la curva concentración versus tiempo

ABC_{0-t}: área bajo la curva desde tiempo 0 a tiempo t

ABC_{0-∞}: área bajo la curva desde tiempo 0 a infinito

ABA: abamectina

ABZ: albendazole

ABZSO: albendazole sulfóxido (sinónimo de ricobendazole)

ABZSO₂: albendazole sulfona

BZD: benzimidazoles

C_{max}: concentración máxima alcanzada del fármaco/metabolito

GI: gastrointestinal/es

HPG: huevos por gramo

HPLC: cromatografía líquida de alta performance

IC90%: intervalo de confianza del 90%

IVM: ivermectina

LEV: levamisole

L3: larva 3 (infectante)

MXD: moxidectin

RBZ: ricobendazole

T_{½el}: tiempo medio de eliminación

T_{max}: tiempo en el que se alcanza la concentración máxima del fármaco/metabolito

TRCH: test de reducción en el conteo de huevos por gramo de materia fecal

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	VI
SUMMARY	IX
PALABRAS CLAVE.....	XI
ABREVIATURAS	XI
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
I.1 La enfermedad parasitaria y su epidemiología.....	2
I.2 Pérdidas productivas y económicas.....	5
I.3 Control parasitario y desarrollo de Resistencia antihelmíntica.....	7
I.4 Combinaciones Antihelmínticas	11
I.5 Hipótesis General	14
I.6 Objetivo General	14
I.7 Diseño Experimental General	14
CAPÍTULO II: DESARROLLO METODOLÓGICO	15
II.1 Metodología experimental	16
II.1.1 Animales experimentales.....	16
II.2 Metodología analítica.....	17
II.2.1 Cuantificación de analitos.....	17
II.2.2 Estudio parasitológico.....	24
II.3 Análisis de datos	25
II.3.1 Análisis Farmacocinético.....	25
II.3.2 Análisis Parasitológico.....	26
II.3.3 Análisis estadístico	27
II.4 Bienestar animal.....	27

II. 5 Bioseguridad	28
CAPÍTULO III: SECCIÓN EXPERIMENTAL I (estudios <i>ex vivo</i>)	29
III.1 Línea de Investigación 1: Estudio de potenciales interacciones	
Farmacodinámicas	30
Introducción.....	30
Experimentos	31
Discusión	38
III.2 Línea de Investigación 2: Acumulación de fármacos en parásitos susceptibles	
y resistentes	40
Introducción.....	40
Experimentos	41
Discusión	48
CAPÍTULO IV: SECCIÓN EXPERIMENTAL II (estudios <i>in vivo</i>)	50
IV.Línea de Investigación 3: Combinaciones de antihelmínticos en bovinos.....	51
Introducción.....	51
Experimentos	53
Discusión	91
CAPÍTULO V	112
V.1 Conclusiones generales y principales aportes de esta tesis	113
V.2 Publicaciones surgidas del trabajo de tesis.....	115
V.2.1 Publicaciones científicas.....	115
V.2.2 Publicaciones de divulgación	115
V.2.3 Comunicaciones a congresos	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 La enfermedad parasitaria y su epidemiología

La parasitosis gastrointestinal (GI) es una de las enfermedades que mayor impacto económico ocasiona en los sistemas pastoriles de producción de carne a nivel mundial (Charlier *et al.*, 2015).

En la Argentina, la región de la Pampa Húmeda presenta las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de los nematodos GI durante todo el año y dado que los sistemas de producción se establecen sobre pasturas permanentes, las enfermedades parasitarias representan un problema de gran importancia. Las parasitosis gastrointestinales tienen un importante efecto sobre la producción, sea por mortandad, enfermedad clínica o subclínica; siendo esta última la de mayor importancia por la dificultad en su correcta valoración y control.

La gastroenteritis verminosa es una enfermedad parasitaria de curso agudo o crónico que afecta primariamente a los animales jóvenes, producida por un complejo etiológico de trichostrongilidios. Las especies más importantes son *Ostertagia ostertagi*, *Haemonchus placei* y *Trichostrongylus axei* de localización abomasal, siendo *O. ostertagi* la de mayor patogenicidad y por lo tanto la que mayor pérdidas productivas provoca. Dentro de los géneros intestinales (menos patógenos), se incluyen *Cooperia oncophora*, *C. punctata* y *C. pectinata*, *Nematodirus helvetianus*, *Trichostrongylus colubriformis* y *Oesophagostomum radiatum* (Fiel *et al.*, 2013). La mayor incidencia de uno u otro género parasitario depende de las condiciones climáticas de cada zona. Para lograr un adecuado control parasitario resulta imprescindible conocer la epidemiología de la enfermedad, es decir su dinámica, involucrando al animal, al parásito, al ambiente y al manejo.

El ciclo biológico de la mayoría de los nematodos gastrointestinales es similar (Fig. I.1); siendo en todos los casos directos, involucrando una fase que se desarrolla sobre el hospedador (sólo el 5 % de la población parasitaria -relación parásito-animal) y otra de vida libre (relación parásito-medio ambiente). La infección parasitaria comienza cuando el animal ingiere forraje infectado con larvas de tercer estadio (L3), las cuales, luego de 3 semanas aproximadamente (período de prepatencia para la mayoría de los géneros) llegan a adultos comenzando con la oviposición. Este período de prepatencia se extiende hasta 4-5 meses cuando se produce la inhibición del desarrollo o hipobiosis, especialmente en el género de *Ostertagia* (se da por estímulos ambientales durante la fase de vida libre) (Fiel *et al.*, 2013).

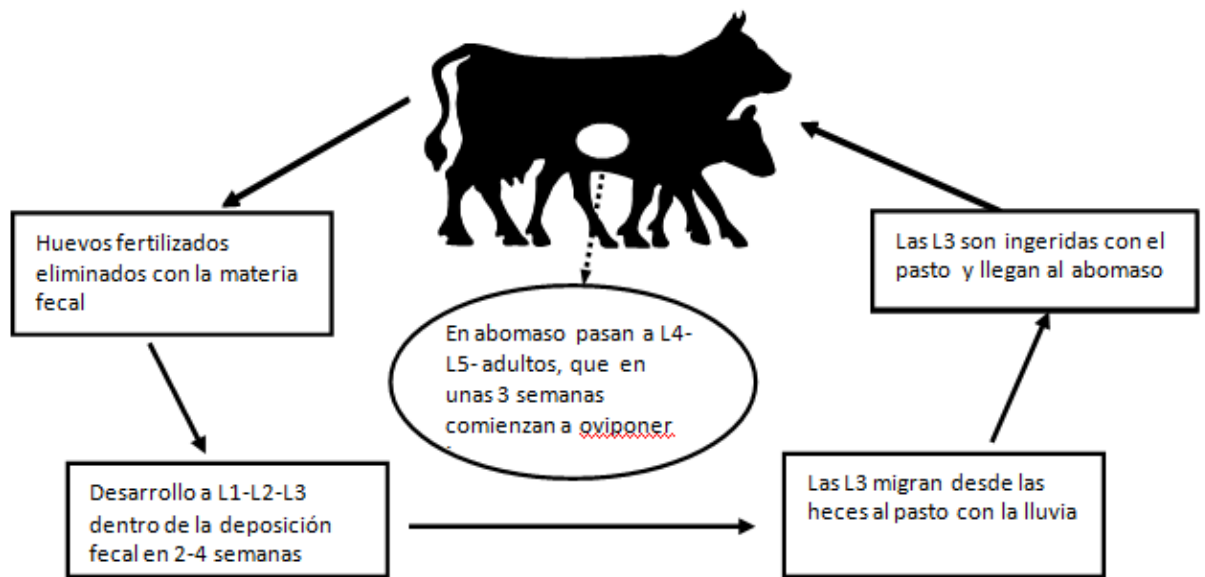


Figura I.1. Ciclo biológico de nematodos gastrointestinales

La fase externa o de vida libre (95% de la población parasitaria) comienza cuando los huevos caen al suelo contenidos en la materia fecal. Éstos comienzan a evolucionar si están las condiciones apropiadas de aireación, humedad y temperatura (rango 5°C-35°C) (Fiel *et al.*, 2013). El desarrollo de huevo a larva (L3) está regulado principalmente por la temperatura, y oscila entre 1-2 semanas en verano hasta 3-6 semanas en otoño e invierno (Fiel *et al.*, 2012). La salida de las larvas infestantes desde la deposición fecal depende de las lluvias, encontrándose la mayor concentración entre el nivel del suelo y los 10 cm de altura de la pastura, siendo las leguminosas las que mayor protección ofrecen en comparación a otras pasturas.

Teniendo en cuenta las condiciones climáticas que caracterizan la Pampa Húmeda, con otoños e inviernos con alta humedad relativa y días sucesivos de neblina y lloviznas, resultan éstas estaciones las más óptimas para la migración larvaria, y así el desarrollo de la enfermedad parasitaria. Contrariamente, en el verano la formación de costras en la superficie de la materia fecal entorpece la salida de L3, de forma que las deposiciones se convierten en reservorios de larvas hasta el siguiente otoño, facilitando así el pasaje de la infección de un ciclo de producción al siguiente (Fiel *et al.*, 2013).

Los animales en pastoreo extensivo y con pasto a discreción, tienden a consumir la parte superior del forraje y evitan comer cerca de las bostas ingiriendo pocas larvas infestantes. En condiciones de pastoreo intensivo los animales son obligados a comer la pastura muy cerca del suelo y de las heces favoreciendo así la incorporación de pastos con larvas infestantes. Además, la alta carga instantánea de los sistemas intensivos aumenta la cantidad de huevos eliminados por unidad de superficie y las heces son distribuidas más uniformemente sobre la pastura ocasionando una mayor contaminación de las mismas. Todas las pasturas permanentes están contaminadas en mayor o menor grado, por lo tanto se puede afirmar que las pasturas son la llave de la transmisión parasitaria, donde las L3 (estadio más resistente) pueden sobrevivir en el pasto entre 4 y 14 meses, dependiendo del género y, especialmente, de la época del año (más sobrevivencia en el invierno y menor en el verano).

La dinámica de los estadios parasitarios es diferente en los distintos sistemas productivos, dependiendo del tipo de explotación, el manejo, la categoría animal, las condiciones climáticas y el nivel de infectividad de las pasturas. Teniendo en cuenta las condiciones climáticas de la Pampa Húmeda (temperatura media anual de 13-18°C, y precipitaciones entre 400-1000 mm anuales), y siendo la recría e internada la categoría más susceptible, se define la contaminación e infectividad de las pasturas basándose en esta categoría.

Los terneros recién destetados (marzo-abril, con 6-8 meses de edad) además de tener que enfrentar el otoño y el invierno, estaciones frías y de carencias nutricionales; no han desarrollado aún la inmunidad suficiente para “limitar” la enfermedad parasitaria. Los terneros transferidos a las pasturas a principios de otoño están expuestos a larvas infestantes que han logrado sobrevivir (principalmente en las deposiciones fecales) durante el verano, ofreciendo el "pie de infección" a esos animales; gracias a las lluvias de otoño que producen su traslación a las pasturas. En general, los niveles de infectividad (L3 en el pasto) en esta época son moderados o bajos, aunque en veranos muy secos la supervivencia de larvas en la materia fecal es más alta, provocando mayor infectividad. A las 3-5 semanas de comenzar el pastoreo, las larvas ingeridas habrán completado su desarrollo, apareciendo los huevos en la materia fecal. Es así que a partir de la introducción de animales jóvenes, la “nueva” contaminación por huevos de la pastura empieza a aumentar progresivamente desde abril-mayo, alcanzando los mayores niveles en los meses de julio-agosto. Mientras que la infectividad se incrementa a partir de mayo-junio, alcanzando niveles máximos en agosto-septiembre, patrones que se repiten año tras año con condiciones climáticas normales. La situación de autoinfección permite que se encadenen varias generaciones parasitarias, produciendo un importante aporte de huevos a las pasturas y condicionando un alto

nivel de infectividad de las mismas durante el período otoño-invernal. Esta situación se agrava por la escasa disponibilidad y calidad forrajera, que obliga a los animales a comer más cerca del suelo, y de las deposiciones fecales, donde se encuentra el mayor número de larvas (Fiel *et al.*, 2013).

Esta situación cambia radicalmente desde la primavera vegetal (octubre) en adelante, cuando disminuye sustancialmente la contaminación, debido a la acción de la inmunidad que limita la oviposición (animales de 15 meses), además de un incremento de larvas en estado de "hipobiosis"; y también se produce una disminución de la infectividad, por el importante crecimiento del forraje que diluye la carga de L3 y la acción directa del sol que condiciona su supervivencia.

En aquellos años en que se producen largas sequías se reduce la infectividad de las pasturas porque las larvas no pueden migrar desde las heces, pero cuando comienzan nuevamente las lluvias hay una explosiva contaminación de las pasturas por la gran cantidad de larvas acumuladas. Por ejemplo, ante sequías invernales, el cuadro de contaminación es más prolongado y se observa un desplazamiento de la infectividad hacia la primavera; lo que determinará una mayor población de larvas hipobióticas en los animales (Fiel *et al.*, 2013).

1.2 Pérdidas productivas y económicas

Teniendo en cuenta que el objetivo de un sistema de cría e internada es lograr un adecuado desarrollo del ternero con una aceptable producción de carne, se debe asegurar una óptima ganancia de peso en estos sistemas. Como se mencionó anteriormente, los terneros de destete son la categoría más susceptible a la parasitosis debido a su falta de inmunidad, y a pesar de ello, son expuestos, por cuestiones de manejo, a pasturas con alta contaminación e infectividad, resultando la categoría más perjudicada por los nematodos GI.

Los parásitos GI generan múltiples trastornos digestivos (modificaciones estructurales y funcionales) y metabólicos en los animales, los cuales resultan en una baja productividad, la cual se refleja principalmente, en una menor ganancia de peso en los terneros de internada. Entrocasso (1988) describe pérdidas subclínicas en la ganancia de peso en animales jóvenes de alrededor de un 20% (15 a 40 kg), por animal y por año de pastoreo, para toda la Pampa Húmeda. En los casos clínicos de la enfermedad, donde se observa diarrea y mal estado general,

las pérdidas pueden ser entre el 30- 40 % (30-60 kg) de peso pudiendo haber mortandad de animales del orden del 1-2% (o superior). Los kilos perdidos o dejados de ganar durante el invierno difícilmente van a ser compensados en la primavera o en el verano, debido a la pérdida de desarrollo. Por otro lado, el aparato digestivo queda disminuido fisiológicamente por las lesiones parasitarias, produciendo retrasos en los ciclos productivos.

Otro efecto de la parasitosis es la depresión del consumo, el cual provoca baja eficiencia de conversión de pasto a carne en los animales parasitados (Suarez y Cristel, 2005), contribuyendo en gran proporción a la reducción del peso de los animales afectados. También hay graves pérdidas en la calidad de la carne y del rendimiento de la res (Fiel *et al.*, 2013). Las lesiones parasitarias provocan trastornos metabólicos y reducción del apetito que conllevan además a alteraciones en la composición corporal de los animales crónicamente parasitados. Al afectar la digestión y el metabolismo de proteínas (por la limitada conversión de pepsinógeno a pepsina, a causa de la falta de ácido clorhídrico) se reduce la síntesis y deposición muscular. Del mismo modo se ven afectados el metabolismo energético y mineral en detrimento de la deposición grasa y ósea, respectivamente. Estos cambios generan un menor rendimiento de la res debido a la reducción de la deposición de músculo y grasa y al aumento de tamaño del tubo digestivo inducido por las lesiones parasitarias (hiperplasia/hipertrofia de los distintos segmentos del tracto digestivo) (Giudici *et al.*, 2013).

Otro efecto se observa en los parámetros reproductivos en las hembras. En la recria de vaquillonas de reposición el efecto de los parásitos sobre la ganancia de peso es similar al indicado para los animales de invernada pudiendo observarse diferencias de peso de entre 42 y 54 kg. Esta situación afecta el desarrollo corporal y la actividad reproductiva. Las vaquillonas de 15 meses parasitadas presentan al tacto un menor desarrollo de los órganos genitales y falta de madurez sexual que las hace no aptas para el servicio. En sistemas con servicio de 27 meses las vaquillonas con buen peso y madurez sexual pueden ver afectado, a consecuencia de la parasitosis, su desarrollo óseo especialmente a nivel del área pélvica cuya reducción genera un mayor índice de partos distócicos (Fiel *et al.*, 2013).

Al transformar los efectos negativos de la parasitosis GI en la invernada a valores reales de mercado, se ve claramente el gran impacto económico de esta enfermedad. Además de lo que "se deja de ganar", la parasitosis provoca un aumento en los costos de producción; ya que hay que contemplar el costo de los tratamientos antihelmínticos, especialmente instaurados cuando aparecen signos clínicos en el ganado. Sumado a esto, el costo de otros medicamentos asociados

a la parasitosis clínica incrementa los gastos asociados a la enfermedad parasitaria. La disminución del apetito deriva en una ineficaz utilización de las pasturas, las cuales pierden su calidad nutricional óptima sin ser aprovechadas. Finalmente, la demora en los ciclos de producción resta eficiencia y rentabilidad al sistema (Suarez y Cristel, 2005).

1.3 Control parasitario y desarrollo de Resistencia antihelmíntica

Con todo lo expuesto hasta aquí, se puede afirmar que el control parasitario es una de las variables que mayor correlación presenta con el aumento de la producción, por lo que se lo puede considerar una "tecnología de bajo costo y alto impacto en producción" (Fiel *et al.*, 2013). Está claro que se debe buscar un equilibrio para convivir con los parásitos que asegure pérdidas mínimas en los sistemas de producción ganadera.

Más allá que pueden existir algunas medidas alternativas al control químico, el uso de fármacos antihelmínticos continúa siendo una herramienta clave en el control parasitario en los sistemas productivos. Los principales grupos de antihelmínticos nematodocidas disponibles incluyen a las lactonas macrocíclicas (LM) (ivermectina [IVM], moxidectin [MXD], abamectina [ABA], entre otras), los benzimidazoles (BZD) (ricobendazole [RBZ], albendazole [ABZ], entre otros) y los imidazotiazoles (levamisole [LEV]). Dado a que la presente Tesis Doctoral involucra estudios fármaco-parasitológicos relacionados al uso de los antihelmínticos IVM, RBZ (o ABZSO) y LEV, se desarrollan a continuación aspectos farmacológicos generales que caracterizan a dichas moléculas:

- Lactonas macrocíclicas

Las LM se dividen en dos grandes familias según sea el actinomiceto de cuya fermentación provienen: avermectinas y milbemicinas. ABA, IVM, doramectina y eprinomectina pertenecen a las avermectinas, mientras que MXD pertenece a la familia de las milbemicinas. Ambas familias poseen actividad sobre endoparásitos y ectoparásitos, recibiendo la denominación de fármacos endectocidas, lo cual define la combinación de sus efectos nematodocida, insectocida y acaricida.

IVM es la LM más utilizada en medicina veterinaria, ya que tiene un amplio espectro de acción tanto sobre parásitos internos (nematodos) como externos (artrópodos) en todas las especies de animales domésticos. La IVM es altamente efectiva contra los estadios

inmaduros y adultos de nematodos GI y pulmonares (Egerton *et al.*, 1981) así como también contra varios artrópodos cuando se administra en forma subcutánea (Campbell *et al.*, 1983). Sin embargo, no tiene efecto ovicida ni actividad antiparasitaria sobre cestodos y trematodos. La IVM es un fármaco de elevada liposolubilidad, elevado volumen de distribución y prolongada persistencia en el organismo. Con respecto al mecanismo de acción, produce parálisis en artrópodos y nematodos al incrementar la permeabilidad de la membrana celular para los iones cloruro (Cl⁻), con la resultante hiperpolarización y parálisis a nivel de la musculatura faríngea y somática de los parásitos (Geary, 2005).

- *Benzimidazoles*

RBZ es el metabolito activo de ABZ, un miembro de la familia de los BZD-metilcarbamatos. El RBZ también es un compuesto antihelmíntico de amplio espectro, ya que es efectivo contra nematodos GI y pulmonares (Campbell, 1990). En algunos países latinoamericanos incluido Argentina, RBZ ha sido formulado en una solución acuosa para poder ser administrado por vía subcutánea en bovinos, la cual es la vía más usada y aceptada por veterinarios y productores para su aplicación a campo. El mecanismo de acción del RBZ se basa en su unión a la sub unidad β de la tubulina, proteína soluble que constituye la estructura básica de los microtúbulos. A partir de la unión BZD-tubulina en los parásitos susceptibles, se produce una disrupción del equilibrio microtúbulos-tubulina, alterándose todas las funciones celulares, lo cual determina la expulsión del parásito (Lacey, 1990). Con respecto al metabolismo, ABZ-sulfona (ABZSO₂) es el principal metabolito detectado en la circulación sistémica tras la administración de RBZ en bovinos (Lanusse *et al.*, 1998). Este metabolito carece de actividad antihelmíntica.

- *Imidazotiazoles*

LEV es un antihelmíntico de la familia de los imidazotiazoles, y efectivo contra nematodos GI y pulmonares (Courtney y Roberson, 1995). Ejerce su acción mediante un agonismo del receptor nicotínico de la acetilcolina (agonista colinérgico), a partir de lo cual se abre el canal iónico permitiendo la entrada de sodio al interior celular (Robertson y Martin, 1993). En consecuencia, se produce una rápida contracción muscular y el desprendimiento de los parásitos de sus sitios de localización. El margen de seguridad de LEV es estrecho. Los signos de intoxicación se asocian a efectos muscarínicos y nicotínicos entre los que destacan salivación, defecación, dificultad respiratoria, miosis, ataxia, entre otros.

En los últimos años, con el objetivo de minimizar las consecuencias de los efectos deletéreos de los parásitos, y sumado al costo relativamente bajo, los compuestos antiparasitarios comenzaron a utilizarse rutinariamente en forma sistemática y a cortos intervalos (Anziani y Fiel, 2015). De esta forma, en el último tiempo el control parasitario se ha basado en el uso exclusivo de antihelmínticos, los cuales se han aplicado sin considerar la epidemiología parasitaria y en forma indiscriminada, lo cual ha llevado al desarrollo de resistencia por parte de los principales géneros parasitarios (Wolstenholme *et al.*, 2004).

La resistencia antihelmíntica se define como una disminución en la eficacia de un antihelmíntico frente a poblaciones parasitarias que normalmente son susceptibles al mismo (Sangster y Gill, 1999). Esto puede ser consecuencia de una modificación genética o de un incremento en la frecuencia de expresión de un carácter hereditario. En ambos casos, se confiere a ciertos individuos de una población parasitaria la capacidad de sobrevivir al efecto farmacológico de concentraciones terapéuticas de un antihelmíntico (Prichard *et al.*, 1980). Múltiples factores determinan la velocidad de desarrollo de resistencia en una población parasitaria. Entre ellos se encuentran la frecuencia de tratamientos (presión de selección), la eficacia intrínseca del fármaco, la heredabilidad del carácter que confiere resistencia, el potencial biótico del parásito y su intervalo entre generaciones, la frecuencia de alelos resistentes previo al uso del fármaco, el número de genes involucrados en los mecanismos de resistencia y si estos son heredados de modo dominante o recesivo (Jabbar *et al.*, 2006). Sumado a esto, la sub-dosificación ha sido indicada como responsable de la selección de parásitos resistentes (Smith, 1990). El desarrollo de especies y poblaciones parasitarias con resistencia a uno o más fármacos antihelmínticos fue inicialmente un problema grave en las especies ovinas y caprinas (Eddi *et al.*, 1996; Leathwick *et al.*, 2000; Nari *et al.*, 2000). En bovinos, la aparición de especies de nematodos resistentes ha sido más lenta debido a la menor frecuencia de tratamientos antihelmínticos y la protección que ofrece la cubierta de las heces a los estadios de vida libre, incrementando la población parasitaria “en refugio”, es decir “protegida” de la acción del fármaco, determinando una menor presión de selección. Sin embargo, desde el año 2000 los reportes referidos a la aparición de parásitos resistentes se han incrementado (Anziani *et al.*, 2001, 2004; Fiel *et al.*, 2001; Mejía *et al.*, 2003; Waghorn *et al.*, 2006; Soutello *et al.*, 2007; Suarez y Cristel, 2007; Gasbarre *et al.*, 2009; Edmonds *et al.*, 2010). Actualmente, la resistencia a los antihelmínticos está difundida en la Argentina (presente en 95.2% de 62 rodeos estudiados distribuidos en 7 provincias del país). El principal fármaco implicado en casos de resistencia es IVM (93.5%), aunque también alcanza al RBZ (27.9%), y no aún al LEV (Cristel *et al.*, 2017). La evolución de resistencia a los antiparasitarios

es un proceso complejo dependiente de factores intrínsecos (fuera del control directo del hombre) relacionados directamente con el parásito; como también de factores operativos, que son aquellos que están bajo el control del hombre (elección del antihelmíntico a utilizar, el tiempo y frecuencia de aplicación, la concentración y el método de aplicación) (Nari, 2003). Diferentes factores inducen el desarrollo de resistencia antihelmíntica, como el uso indiscriminado de antiparasitarios, la alta frecuencia de desparasitaciones, la falta de rotación de principios activos, el uso de formulaciones de efecto prolongado, la administración de antihelmínticos sin el criterio profesional del veterinario, por lo tanto sin tener en cuenta la epidemiología de la enfermedad (principalmente de la población parasitaria en refugio), etc.. Los dos factores de manejo que mayor influencia tienen en la selección de genes resistentes en nematodos de los bovinos son la frecuencia de los tratamientos y la proporción de parásitos en refugio (Coles, 2002). El refugio es la proporción de la población parasitaria no expuesta al tratamiento antihelmíntico, y que por lo tanto no sufre presión de selección para el desarrollo de resistencia (por ej. estadios de vida libre en el pasto, parásitos adultos en animales que no reciben tratamiento, larvas inhibidas que no son alcanzadas por el tratamiento, etc.) (Sutherland y Leathwick, 2011). Cuanto mayor es la proporción de la población en refugio, menor es la selección por resistencia (Van Wyk, 2001; Waghorn *et al.*, 2008). De esta forma, después de los tratamientos antihelmínticos en otoño e invierno (alta población en refugio) las larvas derivadas de parásitos sobrevivientes al tratamiento se “diluyen” con la población parasitaria disponible en el ambiente, hecho que disminuye la presión de selección sobre la población parasitaria. Situación opuesta sucede en el verano, cuando la población parasitaria en refugio es mucho menor, razón por la cual si se desparasita en esta época, la presión de selección resulta mucho más marcada favoreciendo el desarrollo de poblaciones resistentes al antihelmíntico (Anziani y Fiel, 2015). Cuando el control de parásitos se hace aplicando antihelmínticos indiscriminadamente, mucho más rápidamente aparece la resistencia (Eddi *et al.*, 2002). Suarez y Cristel (2007) demostraron una correlación positiva entre la frecuencia de tratamientos al año y el desarrollo de resistencia, encontrando que los rodeos que presentaron resistencia antihelmíntica fueron tratados, en promedio, 4 veces al año, mientras que la frecuencia sólo fue de 1.9 tratamientos al año en rodeos sin resistencia.

En el futuro inmediato, los antihelmínticos seguirán jugando un papel esencial en los programas de control de los nematodos GI bovinos, ya que no existen tecnologías alternativas disponibles para su aplicación a campo. Los antiparasitarios deben ser considerados como un recurso no renovable, en la medida que la resistencia va avanzando progresivamente sobre los grupos

químicos disponibles. En este contexto, es imprescindible el uso racional de los fármacos utilizados en la actualidad para mantener su eficacia y vida útil, y así lograr un balance entre productividad y sustentabilidad.

1.4 Combinaciones Antihelmínticas

El uso de antihelmínticos continúa siendo la alternativa más práctica de aplicación a campo para el control parasitario. Con el objetivo de minimizar las probabilidades de un fracaso terapéutico tras el tratamiento antihelmíntico, se ha propuesto el uso de combinaciones de antihelmínticos que incluyen varios principios de actividad nematodocida con diferente mecanismo de acción (Anderson *et al.*, 1988; Geary *et al.*, 2012). Dichas formulaciones se encuentran actualmente disponibles para su uso en países como Australia, Nueva Zelanda y Uruguay. Su utilización se basa en que los rumiantes se ven afectados por infecciones parasitarias mixtas (incluyendo diferentes géneros de parásitos GI), por lo tanto dentro de una población parasitaria pueden coexistir sub-poblaciones con resistencia individual a diferentes fármacos. De esta forma, el uso simultáneo de dos o más fármacos podría derivar en un efecto antihelmíntico “cruzado” a partir del cual se logre un efectivo control parasitario. No obstante, es escasa la información disponible sobre las potenciales interacciones farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo, eliminación) y/o farmacodinámicas (eficacia antihelmíntica) que pueden ocurrir entre los principios activos de las diferentes formulaciones empleadas y que obviamente, podrían afectar el resultado final de un tratamiento.

La Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP) definió las circunstancias en las cuales el uso de combinaciones de nematodocidas puede resultar útiles en producción animal (Geary *et al.*, 2012). Desde un punto de vista teórico, puede afirmarse que el uso de combinaciones de fármacos retarda el desarrollo de resistencia si se dan las siguientes condiciones: que los mecanismos de resistencia a los principios activos incluidos en la formulación presenten un control genético independiente, que dichos mecanismos sean recesivos, que exista una importante población parasitaria en refugio, que los compuestos combinados presenten similar persistencia en el organismo del animal tratado y que los genes para resistencia sean raros en la población tratada (Bartram *et al.*, 2012). Más allá de la importancia relativa de estos diferentes puntos, el uso de antihelmínticos en forma combinada va necesariamente a retardar el desarrollo de resistencia, si cada uno de los principios activos incluidos en la formulación presenta una eficacia

cercana al 100%. Esto es lógico dado que las posibilidades de encontrar en una población parasitaria un parásito que sea portador de dos o más mecanismos de resistencia (a dos o más de los principios activos incluidos en la formulación), es mucho más baja que la posibilidad de encontrar un parásito que manifieste un mecanismo de resistencia (por ej. una mutación puntual en el gen de la β -tubulina que le confiera resistencia a los BZD). De esta forma, la supervivencia de parásitos con genotipo resistente sería mucho menor tras el uso de un producto combinado, que tras el tratamiento con un solo fármaco. Estos pocos parásitos, de existir, serían “diluidos” por los genes aportados por los parásitos no seleccionados por el tratamiento (en refugio), retardando el predominio de los genes de resistencia en la población parasitaria. Sin embargo, la presencia de poblaciones parasitarias totalmente susceptibles a los diferentes principios activos es cada día más rara, en especial en ovinos y caprinos. Esta situación en principio, no parece ser tan grave en bovinos como lo es en especies rumiantes menores, dejando algún “margen de maniobra” para el uso de combinaciones nematocidas. Sin embargo, dado que el uso a ciegas de esta estrategia seguramente carezca de sustentabilidad, es necesario conocer las potenciales interacciones farmacocinéticas-farmacodinámicas entre los fármacos empleados en una combinación antes de su uso práctico. En la Figura I.2 se presenta un resumen de las bases farmacológicas de las interacciones entre drogas.

INTERACCIONES ENTRE DROGAS: BASES FARMACOLÓGICAS	
<u>Interacción Farmacocinética</u>	<u>Interacción Farmacodinámica</u>
<p>* Formación de complejos No-absorbibles - ej. Tetraciclinas-Ca²⁺</p> <p>* Modulación del transporte de la droga -ej. Moxidectin-Loperamida; Ivermectina-Verapamilo</p> <p>* Competición por el sitio de unión a la proteína -ej. Fenilbutazona-Warfarina</p> <p>* Inhibición/Inducción del metabolismo -ej. Netobimin-Metimazole; Oxfendazole-Butóxido de piperonilo; Piretroides-Butóxido de Piperonilo (Inhibición) -ej. Fenobarbital-Hormonas esteroideas (Inducción)</p> <p>* Competición por excreción/secreción renal -ej. Penicilina G-Probenecid</p>	<p>* Antagonismo - ej. Atropina-Acetilcolina</p> <p>* Sinergismo - ej. Triple combinación de Sulfamidas (Adición) - ej. Sulfamida-Trimetroprim (Potenciación)</p>

Figura I.2. Bases farmacológicas de las interacciones entre fármacos (Prescott, 2000).

Para evaluar las posibles interacciones farmacodinámicas que pueden existir al administrar diferentes drogas simultáneamente, además de medir el efecto de dicha combinación, se requiere medir el efecto de cada fármaco administrado en forma individual. Las posibles interacciones farmacodinámicas incluyen indiferencia, antagonismo, sinergismo de suma o aditivo y sinergismo de potenciación (Bourgeois, 2005). Se habla de indiferencia cuando no hay interacción entre las moléculas utilizadas, mientras que existe antagonismo cuando una molécula disminuye el efecto de la otra. En el sinergismo de suma o aditivo, las moléculas "suman" sus efectos individuales; y en el sinergismo de potenciación, el efecto obtenido tras la administración conjunta de dos moléculas es mayor al esperado tras la simple suma de sus efectos individuales. Este último caso sería ideal si en una población parasitaria se encuentran presentes parásitos resistentes, porque podría ocurrir que dos drogas de baja eficacia a raíz del fenómeno de resistencia, actúen sinérgicamente de tal forma que el producto combinado alcance la eficacia antihelmíntica original (Lanusse *et al.*, 2014). Se ha descrito evidencia de sinergismo entre el antihelmíntico benzimidazole fenbendazole y el LEV (Miller y Craig, 1996), ensayo en el cual se obtuvo un porcentaje de reducción del conteo de huevos (% RCH) del 62% al implementar dicha combinación; comparada con un % RCH del 1% y 23% cuando se administraron ambos fármacos en forma individual. Otro ejemplo de este tipo de interacción farmacodinámica pareciera ocurrir entre el nuevo antihelmíntico derquantel y la lactona macrocíclica ABA (Puttachary *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta el momento, la mayoría de los resultados experimentales demuestran que los mejores resultados terapéuticos obtenidos tras la administración de un producto combinado, se explican por un efecto aditivo entre los diferentes principios activos que componen dicho producto (Lanusse *et al.*, 2014).

Con respecto a las interacciones farmacocinéticas, las mismas ocurren cuando un fármaco modifica la absorción, distribución, biotransformación y/o eliminación de otro. En general, este tipo de interacciones se dan por la competencia que se establece entre las moléculas administradas principalmente a nivel de unión a proteínas plasmáticas, metabolismo y/o excreción mediada por proteínas transportadoras de membrana (Lanusse *et al.*, 2014). En el Laboratorio de Farmacología, FCV, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), UNCPBA-CICPBA-CONICET, se han investigado potenciales interacciones farmacocinéticas-farmacodinámicas en ovinos, las cuales fueron observadas por ejemplo entre ABZ e IVM (Alvarez *et al.*, 2008; Entrocasso *et al.*, 2008), IVM, ABZ y LEV (Suarez *et al.*, 2014) así como también entre MXD y closantel (Suarez *et al.*, 2013). Es importante destacar que este tipo de interacciones pueden darse tanto a nivel del animal tratado como del parásito, de tal forma que la acumulación de fármaco puede verse sustancialmente modificada en este, modificándose el efecto antihelmíntico. Por tal razón, antes

que una herramienta de este tipo pueda ser recomendada para su uso práctico, es necesario evaluar las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas que pueden establecerse entre los fármacos utilizados en la combinación, las potenciales ventajas de su uso práctico y factibilidad de un uso sustentable de las mismas.

1.5 Hipótesis General

La presente Tesis Doctoral plantea la siguiente hipótesis general de trabajo: *La combinación de fármacos nematodocidas en bovinos es una herramienta útil para el control de nematodos*

1.6 Objetivo General

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo *caracterizar desde un abordaje fármaco-parasitológico las ventajas/desventajas del uso combinado de fármacos antihelmínticos en bovinos parasitados con nematodos susceptibles/resistentes a los fármacos evaluados.*

1.7 Diseño Experimental General

La presente Tesis Doctoral se divide en dos Secciones Experimentales en las cuales se realizaron estudios *ex vivo* (Sección Experimental I) e *in vivo* (Sección Experimental II).

SECCIONES EXPERIMENTALES:

- SECCIÓN EXPERIMENTAL I: "*Estudios fármaco-parasitológicos bajo condiciones ex vivo*"

Línea de Investigación 1: Estudio de potenciales interacciones farmacodinámicas

Línea de Investigación 2: Acumulación de fármacos en parásitos susceptibles y resistentes

- SECCIÓN EXPERIMENTAL II: "*Estudios fármaco-parasitológicos bajo condiciones in vivo*"

Línea de Investigación 3: Combinaciones de antihelmínticos en bovinos

CAPÍTULO II: DESARROLLO METODOLÓGICO

II.1 Metodología experimental

La estrategia de investigación que se siguió en la presente Tesis Doctoral implicó la realización de todos los experimentos *in vivo* en establecimientos comerciales de producción ganadera, por lo que se trabajó en todos los casos con animales parasitados naturalmente. Mientras que los experimentos *ex vivo* y el procesamiento de muestras tanto para los estudios farmacocinéticos como parasitológicos se realizaron en el Laboratorio de Farmacología, FCV, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), UNCPBA-CICPBA-CONICET.

II.1.1 Animales experimentales

II.1.1.a Sección Experimental I (estudios *ex vivo*)

Si bien el presente plan de trabajo está enfocado al estudio de combinaciones antihelmínticas en bovinos, para llevar a cabo los estudios *ex vivo* se utilizó el parásito ovino *H. contortus* como modelo de nematodo, dado que mantenemos el mismo en condiciones de laboratorio y los aislamientos susceptibles y resistentes se encuentran caracterizados. Para los experimentos de la presente sección se utilizaron L3 y parásitos adultos. Para esto, se mantuvieron ovinos infectados artificialmente con aislamientos susceptible y resistente (a IVM y BZD) de *H. contortus*. A partir de estos animales se hicieron cultivos de materia fecal, y luego de 15 días en cámara climática se recuperaron las L3 susceptibles y resistentes mediante la técnica de Baermann. Estas larvas se mantuvieron en la heladera a 8°C. Por otro lado, a partir de las L3 se infectaron más corderos para sacrificarlos y así recuperar especímenes adultos de *H. contortus* directamente del abomaso.

II.1.1.b Sección Experimental II (estudios *in vivo*)

Previo al inicio de cada experimento de la presente Sección Experimental, en cada establecimiento ganadero comercial se seleccionaron animales de una población de bovinos de similares características (edad, peso, estado corporal y raza). Se incluyeron en cada experimento animales que tuvieran al menos un recuento de huevos por gramo de materia fecal (HPG) de 150. En todos los casos se trabajó con terneros de 6-10 meses de edad, los cuales tenían que haber

ingresado al establecimiento al menos dos meses antes que se inicie el ensayo. Esto aseguró que siempre se evalúe la carga parasitaria propia del establecimiento.

Siguiendo en todos los casos un diseño experimental 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 *in vivo* presentaron un grupo Control en el cuál los animales no recibieron tratamiento antihelmíntico.

II.2 Metodología analítica

II.2.1 Cuantificación de analitos

II.2.1.a Químicos

Para la validación de la metodología analítica se utilizaron estándares puros (>99% de pureza) de referencia de IVM, ABA, LEV (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA), ABZ, ABZSO, ABZSO2 y oxibendazole (OBZ) (Schering Plough, Kenilworth, EEUU). Los solventes (acetonitrilo y metanol) usados durante la extracción y el análisis de las drogas fueron de grado HPLC y provistos por Sintorgan® (Buenos Aires, Argentina). El agua utilizada fue destilada y posteriormente desionizada utilizando un sistema de purificación de agua (Simplicity®, Millipore, Brasil).

II.2.1.b Preparación de estándares

Los estándares de las diferentes moléculas utilizadas a lo largo de la Tesis fueron solubilizados en metanol (grado HPLC, Sintorgan®, Buenos Aires, Argentina) para obtener soluciones madre de 1000 µg/ml (ABZ, ABZSO, ABZSO2, OBZ y LEV) o 1000 ng/ml (IVM y ABM). A partir de las mismas se realizaron sucesivas diluciones 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. Una vez preparadas las diferentes diluciones fueron conservadas a 4°C.

II.2.1.c Extracción físico-química de analitos

Para la extracción físico-química de los analitos desde la matriz experimental (*H. contortus* plasma bovino o materia fecal bovina), se procedió de diferente manera según el analito en estudio. En general la muestra fue sometida a procesos de agitación (Multi-tube vortexer, VWR Scientific Products, West Chester, PA, EEUU) con solventes no polares (acetonitrilo) y centrifugación (Jouan®, BR 4i Centrifuge, Saint Herblain, Francia) o directamente a un proceso de extracción en fase sólida para lo cual se utilizaron cartuchos de C18 (Waters Associates, Milford, MA, EEUU). La extracción en fase sólida fue realizada utilizando un Vacuum Mannifold Lichrolut (Merck, Nogent-Sur-Marne Cedex, Francia). La elusión de las moléculas desde los cartuchos se realizó utilizando metanol y la misma fue evaporada (Speed-vac, Savant, EEUU o por evaporación por flujo de nitrógeno) y resuspendida en fase móvil para su posterior análisis por HPLC.

Benzimidazoles

La técnica utilizada para la extracción de los diferentes antihelmínticos BZD bajo estudio se basó en técnicas previamente descritas en la bibliografía (Alvarez *et al.*, 2000), las cuales se adaptaron a cada matriz en estudio.

Haemonchus contortus (Sección Experimental *ex vivo*)

Los parásitos adultos *H. contortus* (0.1 g) fueron homogeneizados y fortificados con 10 µL de estándar interno (OBZ, 40 µg/mL) y 1 mL de acetonitrilo. Posteriormente, se procedió a la extracción líquida, la cual consistió en: agitación en multivortex (10 minutos), sonicación (10 minutos) y centrifugación (a 3500 rpm durante 10 minutos a 5°C). Después de recuperar el sobrenadante, la muestra fue sometida a una segunda vuelta de extracción líquida. Finalmente, luego de juntar ambos sobrenadantes, se le agregó una parte igual de agua y se realizó la extracción sólida. Para la cual la muestra se inyectó en columnas de extracción en fase sólida de C18 (Strata®, RP-18 100 mg, Phenomenex, CA, USA), las cuales fueron previamente acondicionadas con 0.5 mL de metanol seguido por 0.5 mL de agua. Una vez inyectadas las muestras experimentales en las columnas, fueron lavadas con 2 mL de agua y el analito fue eluido con 2 mL de metanol. El metanol eluido se evaporó a sequedad en un baño de agua a

56°C en una atmósfera de nitrógeno. Finalmente las muestras fueron re-suspendidas en 100 µL de acetonitrilo y 200 µL de agua, para luego ser inyectadas directamente en el HPLC.

Plasma bovino (Sección Experimental *in vivo*)

A una alícuota de 1 mL de plasma se la fortificó con 25 µL de estándar interno (OBZ, solución de 40 µg/ml) y se la inyectó en columnas de extracción en fase sólida de C18 (Strata®, RP-18 100 mg, Phenomenex, CA, USA), las cuales fueron previamente acondicionadas con 0.5 mL de metanol seguido por 0.5 mL de agua. Una vez inyectadas las muestras experimentales en las columnas, fueron lavadas con 2 ml de agua y el analito fue eluído con 2 mL de metanol. El metanol eluído se evaporó a sequedad en un baño de agua a 56°C en una atmósfera de nitrógeno. Finalmente las muestras fueron resuspendidas en 100 µL de acetonitrilo y 200 µL de agua, para luego ser inyectadas directamente en el HPLC.

Lactonas macrocíclicas

La metodología de extracción fisico-química de IVM se realizó siguiendo la técnica descrita por (Alvinerie *et al.*, 1993) y posteriormente adaptada por (Lifschitz *et al.*, 1999). La técnica mencionada se adaptó para cada matriz en estudio.

Haemonchus contortus (Sección Experimental *ex vivo*)

Los parásitos adultos *H. contortus* (0.1 g) fueron homogeneizados y fortificados con 10 µL de estándar interno (ABA, 1 ng/10 µL) y 1 mL de acetonitrilo. Posteriormente, se procedió a la extracción líquida, la cual consistió en: agitación en multivortex (10 minutos), sonicación (10 minutos) y centrifugación (a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C). Después de recuperar el sobrenadante, la muestra fue sometida a una segunda vuelta de extracción líquida. Luego de juntar ambos sobrenadantes, se le agregó una parte igual de agua y se realizó la extracción sólida. Para la cual la muestra se inyectó en columnas de extracción en fase sólida de C18 (Strata®, RP-18 100 mg, Phenomenex, CA, USA), las cuales fueron previamente acondicionadas con 2 mL de metanol seguido por 2 mL de agua. Una vez inyectadas las muestras experimentales

en las columnas, fueron lavadas con 1 mL de agua y 1 mL de agua/metanol (75:25), y el analito fue eluido con 1.5 mL de metanol. El metanol eluido se evaporó a sequedad en un baño de agua a 56°C en una atmósfera de nitrógeno. Posteriormente la resuspensión se realizó en 100 µL de una solución de N-metilimidazole (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) en acetonitrilo (1:1) (De Montigny, Shim y Pivinichny, 1990). Para iniciar la derivatización, se agregaron 150 µL de una solución de ácido trifluoroacético anhídrido (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) en acetonitrilo (1:2). Finalmente, una alícuota de la muestra (100 µL) se inyectó directamente en el HPLC.

Plasma bovino (Sección Experimental *in vivo*)

A una alícuota de plasma (1.0 mL) se le adicionaron 50 µL de ABA (estándar interno 2 ng/10 µL) y 1.0 mL de acetonitrilo. Después de agitar la mezcla durante 20 minutos, la solución se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm. Posteriormente, el sobrenadante fue inyectado en cartuchos de C18 (Strata®, RP-18 100 mg, Phenomenex, CA, USA). Previamente a la inyección del sobrenadante, los cartuchos fueron acondicionados con 2 mL de metanol y 2 mL de agua. Luego de la inyección del sobrenadante, se realizó un primer lavado de los cartuchos con 1 mL de agua, seguido por un segundo lavado con 1 mL de agua/metanol (75:25). La elución del analito interno se realizó con 1.5 mL de metanol. El metanol recuperado fue evaporado a sequedad en un baño de agua a 56°C en una atmósfera de nitrógeno. Posteriormente la resuspensión se realizó en 100 µL de una solución de N-metilimidazole (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) en acetonitrilo (1:1) (De Montigny *et al.*, 1990). Para iniciar la derivatización, se agregaron 150 µL de una solución de ácido trifluoroacético anhídrido (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) en acetonitrilo (1:2). Finalmente, una alícuota de la muestra (100 µL) se inyectó directamente en el HPLC.

Materia fecal bovina (Sección Experimental *in vivo*)

La muestra de materia fecal bovina (0.5 g) fue homogeneizada con 0.5 mL de agua y suplementada con 25 µL de estándar interno (ABA, 2 ng/10 µL) y 1 mL de acetonitrilo. Posteriormente, se procedió a la extracción líquida, la cual consistió en: agitación en multivortex (10 minutos), sonicación (10 minutos) y centrifugación (a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C).

Después de recuperar el sobrenadante, la muestra fue sometida a una segunda vuelta de extracción líquida. Luego de juntar ambos sobrenadantes, se le agregó una parte igual de agua y se realizó la extracción sólida. Para la cual la muestra se inyectó en columnas de extracción en fase sólida de C18 (Strata®, RP-18 100 mg, Phenomenex, CA, USA), las cuales fueron previamente acondicionadas con 2 mL de metanol seguido por 2 mL de agua. Una vez inyectadas las muestras experimentales en las columnas, fueron lavadas con 2 mL de agua y 2 mL de agua/metanol (75:25), y el analito fue eluído con 1.5 mL de metanol. El metanol eluído se evaporó a sequedad en un baño de agua a 56°C en una atmósfera de nitrógeno. Posteriormente la resuspensión se realizó en 100 µL de una solución de N-metilimidazole (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) en acetonitrilo (1:1) (De Montigny *et al.*, 1990). Para iniciar la derivatización, se agregaron 150 µl de una solución de ácido trifluoroacético anhídrido (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) en acetonitrilo (1:2). Finalmente, una alícuota de la muestra (100 µL) se inyectó directamente en el HPLC.

Imidazotiazoles

A una alícuota de 1 mL de plasma se la inyectó en columnas de extracción en fase sólida de C18 (Strata®, RP-18 100 mg, Phenomenex, CA, USA), las cuales fueron previamente acondicionadas con 1 mL de metanol seguido por 1 mL de agua. Una vez inyectadas las muestras experimentales en las columnas, fueron lavadas con 1 mL de agua y el analito fue eluído con 1.5 mL de metanol. El metanol eluído se evaporó a sequedad en un baño de agua a 56°C en una atmósfera de nitrógeno. Luego, las muestras fueron resuspendidas en 100 µL de acetonitrilo y 200 µL de agua. Previamente a ser inyectadas al HPLC, las muestras resuspendidas fueron agitadas en el multivortex (5 minutos), sonicadas (5 minutos) y centrifugadas a 10000 rpm (10 minutos).

II.2.1.d Análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Condiciones cromatográficas para Benzimidazoles

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo de HPLC Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón), formado por dos bombas LC-10AS, un inyector de muestras automático (SIL-10A) con un loop de inyección de 50 µL, un detector espectrofotométrico visible ultravioleta (UV) (SPD-10A), un horno de columnas (Eppendorf TC-45, Eppendorf,

Madison, WI, USA) ajustado a 30°C y un integrador CBM-10A. Se utilizó una columna cromatográfica de C18, partícula esférica de 5 µm, de 250 x 4.6 mm (Kromasil®, Suecia). La detección de los compuestos BZD bajo estudio se realizó a una longitud de onda de 292 nm. La cuantificación de las concentraciones plasmáticas de ABZ, ABZSO y ABZSO₂ se realizó siguiendo el método previamente descrito por (Alvarez *et al.*, 1999). OBZ (1 µg/mL) fue utilizado como estándar interno. La elución desde la fase estacionaria se realizó a un flujo de 1.2 mL/min, utilizando acetonitrilo y buffer acetato de amonio (0.025 M, pH 6.6) como fase móvil. El gradiente de elución empleado cambió linealmente desde 27:73 (acetonitrilo: buffer acetato de amonio) a 50:50 en 5 min, fue mantenido por 5 min y nuevamente cambiado a 27:73 en 3 min, el cual fue entonces mantenido durante 3 min. Los datos obtenidos fueron analizados por medio del software LC Solutions® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

Condiciones cromatográficas para Lactonas Macroclínicas

El método cromatográfico utilizado para la detección de IVM fue los previamente descritos por Alvinerie *et al.* (1993) adaptado por Lifschitz *et al.* (1999). El análisis cromatográfico para la cuantificación de las concentraciones de IVM se realizó utilizando una columna de C18 (Phenomenex®, USA, 5 µm de tamaño de partícula, 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro) la cual se ubicó en un horno de columnas a 30°C (Eppendorf TC-45, Eppendorf, Madison, EEUU). La fase móvil utilizada consistió en una *mezcla* de acetonitrilo, metanol y ácido acético (0.2%) (5:40:55, v/v/v), a un flujo de 1.5 mL/min. La detección se realizó utilizando un detector de fluorescencia (RF-10A) en un cromatógrafo líquido de alta performance (Shimadzu 10 A, Kyoto, Japón), ajustado a una excitación de 365 nm y una emisión de 475 nm. Las muestras fueron inyectadas al sistema cromatográfico utilizando un inyector automático (Sil-VP10A). Los datos obtenidos fueron analizados por medio del software LC Solutions® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). La identificación de IVM realizó comparando los tiempos de retención obtenidos para estándares de máxima pureza. Para la cuantificación de IVM se utilizó ABA como estándar interno.

Condiciones cromatográficas para Imidazotiazoles

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo de HPLC Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón), con dos bombas LC-10AS, un inyector de muestras automático (SIL-10A) con un loop de inyección de 100 µl, un detector espectrofotométrico visible ultravioleta (UV) (SPD-10A), un horno de columnas (Eppendorf TC-45, Eppendorf, Madison, WI, USA) ajustado a 30°C y un integrador CBM-10A. Los datos y los cromatogramas fueron colectados y analizados usando el software LC Solutions® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Se utilizó una columna cromatográfica de C18, partícula esférica de 5 µm, de 250 x 4.6 mm (Phenomenex®, USA). La detección de LEV se realizó a una longitud de onda de 235 nm. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de ácido fosfórico al 85% en trietilamina/ metanol/ acetonitrilo/ agua (0.32/0.5/15.5/83.36) a pH 3 (ajustado con hidróxido de sodio), a un flujo de 1.2 mL/min. Los datos obtenidos fueron analizados por medio del software LC Solutions® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

Identificación y cuantificación de analitos

La identificación de las diferentes moléculas bajo estudio se realizó en base a los tiempos de retención de estándares de referencia de óptima pureza (97-99%). La cuantificación de las concentraciones de las mismas fue calculada comparando las áreas bajo el pico de los mismos con la del estándar interno correspondiente. Las relaciones de área obtenidas fueron interpoladas en curvas de regresión (calibración) construidas en un determinado rango de concentraciones, obtenidas para cada matriz analizada. Para la construcción de las curvas de regresión se utilizó el programa InStat versión 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California EEUU) y el GraphPad Prism 6.0 para Windows. En el caso de LEV, la cuantificación se realizó por la técnica del estándar externo.

Validación de las metodologías analíticas

Las metodologías analíticas descritas para las diferentes moléculas y matrices biológicas fueron debidamente validadas siguiendo las recomendaciones descritas en la conferencia “Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies” (Shah *et al.*, 1992), las cuales incluyeron la determinación de la

linealidad, porcentaje de recuperación, precisión analítica y límite de cuantificación y detección. El criterio de linealidad fue empleado para determinar la relación entre concentración y respuesta del detector. Las curvas de calibración fueron construidas para cada una de las muestras bajo estudio, tras el análisis cromatográfico de estándares preparados con concentraciones conocidas de cada molécula. El análisis de regresión lineal utilizando el método de los cuadrados mínimos (InStat versión 3.0, GraphPad Software, San Diego California EEUU), permitió obtener el coeficiente de correlación de cada molécula. El porcentaje de recuperación (extracción) de cada analito obtenido de las diferentes muestras experimentales a estudiar, fue calculado comparando las áreas absolutas de muestras suplementadas con concentraciones conocidas de droga analizadas por triplicado (n=3), con las áreas obtenidas tras el análisis de estándares preparados en fase móvil. Se analizó el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recuperación de cada molécula desde las matrices a diferentes concentraciones. El límite de detección teórico (LD) se calculó sumando 3 desvíos estándares al ruido de línea de base (n=5) en los tiempos de retención correspondientes a cada analito. El límite de cuantificación (LC) fue determinado como el promedio del ruido de línea de base más 6 desvíos estándares, luego de correr muestras blanco de cada matriz. Para evaluar la precisión del método se estudió la repetibilidad (repetición de una concentración en el mismo día de trabajo) y la reproducibilidad (repetición de una concentración en diferentes días de trabajo). El CV fue utilizado como indicador del grado de repetibilidad/reproducibilidad del método, aceptándose un $CV \leq 15\%$. El CV fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Bolton, 1944):

$$\text{Coeficiente de variación (\%)} = (\text{Desvío estándar} / \text{promedio}) \times 100$$

II.2.2 Estudio parasitológico

II.2.2.a Recuento de huevos de nematodos gastrointestinales por gramo de materia fecal

Para el conteo de huevos de nematodos GI, se utilizó la técnica cuantitativa McMaster modificada (Roberts y O'sullivan, 1950), con una sensibilidad de 20 HPG. Las muestras de materia fecal se obtuvieron en forma individual directamente del recto de cada animal, siendo posteriormente colocadas en bolsas de polietileno debidamente identificadas, las cuales se cerraron desalojando el aire presente. Posteriormente, las muestras obtenidas se mantuvieron refrigeradas (7°C) hasta el momento de su procesamiento y análisis, el cual se realizó dentro de

las 24 horas de obtenidas. Para el procesamiento, se pesaron 3 gr de materia fecal de cada muestra, a las cuales se les añadió 57 mL de solución saturada de cloruro de sodio (densidad 1.200). Posteriormente, la materia fecal se disgregó, y previa agitación, se cargó la cámara de recuento de McMaster con líquido del nivel medio del recipiente. Pasados 5 minutos, se procedió a la observación y recuento de los huevos de nematodos GI presentes utilizando un microscopio óptico (Olympus, Japón, x40).

II.2.2.b Cultivo de larvas

Con el objetivo de determinar la participación relativa de cada género parasitario en el recuento de huevos de nematodos GI (MAFF, 1986), se realizaron coprocultivos individuales y en “pool” de cada grupo experimental (2-4 g por muestra individual). Para ello se les brindó las condiciones necesarias de temperatura (27°C), oxígeno y humedad (70%) para el desarrollo del ciclo de huevo a larvas infectante (L3), las cuales se lograron en una cámara climática (Sanyo, Japón). A los 15 días se recuperaron las L3 a través de la técnica de Baerman y se identificaron. La participación relativa de cada género parasitario se realizó en base al recuento mínimo de 100 L3 de cada cultivo.

II.3 *Análisis de datos*

II.3.1 Análisis Farmacocinético

Previo al inicio de cada ensayo clínico se consideraron las características farmacocinéticas de cada principio activo para determinar el número y la distribución de los tiempos de muestreo individual. Las curvas concentración en función del tiempo para las diferentes moléculas estudiadas, se realizaron en base a los valores individuales de las concentraciones obtenidas en las muestras. Las curvas concentración en función del tiempo para los diferentes fármacos estudiados, se realizó en base a los valores individuales de las concentraciones obtenidas de las muestras utilizando el programa PK Solutions 2.0 (Summit Research Service, CO, USA). Los parámetros determinados fueron el área bajo la curva desde tiempo 0 a tiempo t (tiempo de la última concentración cuantificable) (ABC_{0-t}), el área bajo la curva desde tiempo 0 a infinito ($ABC_{0-\infty}$), la concentración máxima alcanzada (C_{max}), el tiempo en alcanzar la C_{max} (T_{max}), las constantes de velocidad de absorción (k_a) y de eliminación (β), las vidas medias respectivas

($t_{abs} = 0,693/ka$ o $t_{1/2el} = 0,693/\beta$), y el tiempo medio de residencia (TMR). Se determinó la constante de absorción (K_{ab}), usando el método de residuales (Gibaldi y Perrier, 1982). La constante de eliminación (β) se determinó por regresión de mínimos cuadrados de los logaritmos de las 3-5 últimas concentraciones de la fase de eliminación. K_{ab} y β fueron usados para calcular vida media de absorción ($t_{1/2ab}$) y la vida media de eliminación ($t_{1/2el}$), de la siguiente manera: logaritmo natural de $2/K_{ab}$ y logaritmo natural de $2/\beta$. La concentración máxima (C_{max}) y el tiempo que esta es obtenida (T_{max}), fueron leídos en las curvas concentración-tiempo de cada droga en cada animal individual. Para el cálculo del ABC_{0-t} se empleó el método de los trapecoides (Gibaldi and Perrier, 1982), y luego fue extrapolada al infinito ($ABC_{0-\infty}$) dividiendo la última concentración experimental por la constante de eliminación β . La teoría del momento estadístico se aplicó para calcular el tiempo medio de residencia (TMR) según Perrier y Mayersohn (1982).

II.3.2 Análisis Parasitológico

Para calcular la eficacia de las diferentes drogas antihelmínticas se utilizó el Test de Reducción del Conteo de Huevos (TRCH) (Coles *et al.*, 1992), el cual provee una estimación de la eficacia antihelmíntica ante infecciones naturales a través de la comparación de los conteos de huevos por gramo (HPG) de materia fecal en animales antes del tratamiento antihelmíntico y catorce/quince días después del mismo. Los conteos de HPG de un grupo control no desparasitado proveen una medida de los cambios que puedan ocurrir durante ese período. El TRCH tiene como ventajas que, además de poder ser utilizado en todas las especies, pueden incluirse todos los tipos de antihelmínticos y es útil para todos los nematodos que eliminan huevos en la materia fecal. El TRCH que se utilizó es el recomendado por la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (Coles *et al.*, 1992), el cual utiliza la siguiente fórmula:

$$R.C.H. (\%) = 100 (1 - [T2/C2])$$

Donde T2 representa el promedio de los valores de HPG obtenido en el grupo tratado a los 14-15 días post-tratamiento y C2 el promedio de los valores de HPG obtenido en el grupo control a los 14-15 días post-tratamiento.

También se calcularon los intervalos de confianza al 95% según Coles *et al.* (1992). Adicionalmente, la eficacia clínica para cada género parasitario se calculó dividiendo el recuento de huevos del grupo control y de cada grupo tratado según la proporción de L3 de cada género en el coprocultivo asociado (McKenna, 1990a). Un porcentaje de eficacia menor al 90% indica la presencia de resistencia antihelmíntica en la población parasitaria (Coles *et al.*, 1992).

II.3.3 Análisis estadístico

Los parámetros farmacocinéticos y parasitológicos para los animales de los respectivos grupos experimentales, fueron promediados y expresados como media aritmética (X) \pm desvío estándar (DE). El programa InStat (versión 3.0, GraphPad Software, San Diego, California, EEUU) fue utilizado para la evaluación estadística de las diferencias entre los parámetros cinéticos y parasitológicos de los distintos grupos experimentales. Los diferentes valores cinéticos y parasitológicos individuales fueron sometidos a un análisis para evaluar la normalidad de sus distribuciones. En base a estos resultados, análisis paramétricos (Test t, ANOVA + Tuckey) o no paramétricos (Mann Whitney ó Kruskal Wallis), fueron aplicados según cuál corresponda. Los test de hipótesis de eficacia antihelmíntica se efectuaron para un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). La comparación de las diferencias entre los grupos parasitológicos se llevó a cabo usando el test de comparaciones múltiples no paramétrico de Dunn o similar.

II.4 Bienestar animal

Todos los procedimientos experimentales que involucraron el trabajo con animales de experimentación vertebrados (bovinos y ovinos), se realizaron siguiendo normas internacionalmente aceptadas en términos de bienestar animal, y estuvieron de acuerdo a la normativa vigente en la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA (Resolución N° 087/02), regulada por la Comisión de Bienestar Animal, FCV, UNCPBA. Dentro de las mismas, se utilizaron agujas estériles y de bajo calibre (21G) para la toma de muestras de sangre. En aquellos experimentos en los que fue necesario el sacrificio de animales (estudios *ex vivo* con ejemplares adultos de *H. contortus*), dicho sacrificio se realizó por desangrado, previa insensibilización del animal utilizando un dispositivo especial de émbolo cautivo (pistola Blitz Kerner®, Alemania).

II. 5 Bioseguridad

En la presente propuesta Tesis Doctoral no se trabajó con organismos potencialmente patógenos para el hombre. Más allá de esto, para la toma de muestras de sangre se utilizaron guantes descartables. El material punzante fue descartado en recipientes adecuados y el material biológico fue descartado previo autoclavado.

CAPÍTULO III: SECCIÓN EXPERIMENTAL I
(estudios *ex vivo*)

El objetivo general de la presente Sección Experimental fue evaluar las potenciales interacciones farmacodinámicas y/o farmacocinéticas a nivel parasitario (estudios *ex vivo*) de diferentes antihelmínticos utilizados solos o en forma combinada.

Si bien la presente Tesis está enfocada al estudio de combinaciones antihelmínticas en bovinos, para llevar a cabo la Sección Experimental I (estudios *ex vivo*) se utilizó el parásito ovino *H. contortus* como modelo de nematodo, dado que el mismo es mantenido en condiciones de laboratorio y los aislamientos susceptibles y resistentes se encuentran caracterizados. Los experimentos de la presente Sección Experimental se realizaron sobre larvas L3 y sobre parásitos adultos. Para esto, se mantuvieron ovinos infectados artificialmente con aislamientos susceptibles y resistentes (a IVM y BZD) de *H. contortus*. A partir de estos animales se realizaron cultivos de materia fecal, desde los cuales se recuperaron las larvas L3 susceptibles y resistentes mediante la técnica de Baermann. Estas larvas se mantuvieron en la heladera a 8°C (para el Experimento III.1.1). Por otro lado, a partir de las larvas L3 se infectaron corderos, los cuales fueron sacrificados a partir de los 30 días post-infección con el fin de recuperar especímenes adultos de *H. contortus* directamente del abomaso (para los Experimentos III.1.2, III.2.1 y III.2.2).

III.1 Línea de Investigación 1: Estudio de potenciales interacciones Farmacodinámicas

Introducción

En la búsqueda de alternativas que permitan valorar la potencia relativa de diversas moléculas y/o sus metabolitos en condiciones de laboratorio, se han desarrollado diferentes métodos *ex vivo* de evaluación de la motilidad parasitaria (Bennett y Pax, 1986; Kotze, Le Jambre y O'Grady, 2006; Hansen *et al.*, 2014; Storey *et al.*, 2014; Preston *et al.*, 2016). El principio básico detrás de estas técnicas es que, al exponer un parásito a un antihelmíntico, uno de los efectos esperables sobre el parásito, cualquiera sea su mecanismo de acción, es que se vea afectada su motilidad. Por tal motivo, la evaluación de la misma podría ser un indicador importante del efecto de un antihelmíntico (Wolstenholme y Martin, 2014). En un principio, el interés para el desarrollo de estas técnicas se basó en la necesidad de contar con técnicas que permitan detectar problemas de resistencia antihelmíntica más rápidas y menos costosas que las técnicas *in vivo*, como por ejemplo el TRCH. Además y en relación al objetivo de esta Tesis, si se utiliza un rango de

concentraciones del fármaco, a partir de los datos de motilidad obtenidos, se podría definir el efecto de un antihelmíntico/combinaciones de antihelmínticos sobre la población parasitaria describiendo las curvas dosis-respuesta y calculando las EC50 (concentración de fármaco que produce el 50% del efecto máximo) (Wolstenholme y Martin, 2014). Sin embargo, se requiere estandarizar este tipo de técnicas *ex vivo* con el fin de lograr resultados reproducibles y confiables, independientemente del fármaco y/o aislamiento/estadio parasitario evaluado.

Siguiendo el objetivo de buscar alternativas que puedan medir el efecto de un antihelmíntico en condiciones *ex vivo*, se desarrolló un método rápido y objetivo de evaluación de la motilidad parasitaria, basado en el principio de “biospeckle”. El mismo fue realizado en colaboración con investigadores del Área de Parasitología, Fac. Cs. Veterinarias y el Instituto de Física “Arroyo Seco”, Fac. Cs. Exactas, UNCPBA. La técnica de “biospeckle” permite evaluar la motilidad parasitaria mediante el paso de una fuente de luz laser a través del parásito en movimiento lo que genera una perturbación en la imagen, a la cual se le aplica un algoritmo (Pomarico *et al.*, 2004). Dado que las condiciones iniciales de desarrollo de esta técnica cambiaron sustancialmente (mesa de trabajo, tipo y potencia del láser, velocidad de captura de imágenes de la cámara, etc.) fue necesario trabajar en la estandarización de la misma con las nuevas condiciones. Asimismo, se trabajó con otra técnica (ej. observación directa de la motilidad parasitaria) con el fin de evaluar el efecto de los fármacos en estadios adultos de parásitos susceptibles y resistentes.

Experimentos

III.1.1 Puesta a punto de la técnica de “biospeckle” para evaluar la motilidad parasitaria

Objetivo

Validar la técnica de “Biospeckle” a fin de evaluar la motilidad parasitaria.

Diseño y metodología

La técnica de “biospeckle” consiste en evaluar la motilidad parasitaria mediante el paso de una fuente de luz láser a través del parásito en movimiento lo que genera una perturbación en la imagen, la cual es captada por una cámara. Las diferencias (píxeles) entre un número discriminado de “cuadros” de imágenes en un tiempo establecido, es analizado aplicando un

algoritmo específico. Dicho algoritmo establece las diferencias entre “cuadros”, las cuales se atribuyen a las diferencias en motilidad. Con el objetivo de validar la técnica se evaluaron diferentes parámetros: estadio parasitario del nematodo ovino *H. contortus* sometido a análisis, número de parásitos bajo evaluación, temperatura de análisis, número de cuadros analizados por segundo, volumen de agua utilizado y algoritmo de análisis. Se utilizó una cámara (iXon®, Andor, EEUU) de 16 bits de resolución y un láser infrarrojo de 830 nm (Fig. III.1.).

El análisis estadístico se realizó con el programa Instat (versión 3.0, GraphPad Software, San Diego, California, EEUU), en el cual se realizó un análisis paramétrico (ANOVA + Tuckey).

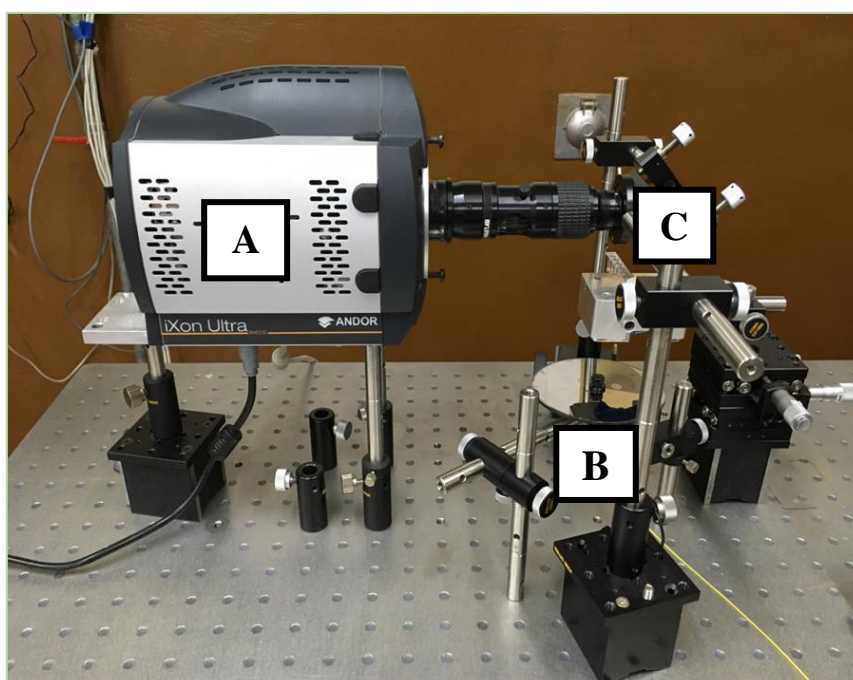


Figura III.1. “Biospeckle” A) Cámara, B) Láser infrarrojo de 830 nm, C) Larvas 3 de *H. contortus*

Resultados

Se seleccionó el estadio L3 susceptible de *H. contortus* como el mejor estadio parasitario para evaluar su motilidad por su rápida obtención y mayor disponibilidad en relación a los parásitos adultos. Con respecto al número de parásitos bajo evaluación, los mejores resultados se obtuvieron con un rango de 180-220 L3 y a temperatura ambiente (25°C). Se trabajó con 200 µL de volumen final de agua. Con respecto a los cuadros por segundo se mejoró de 24 a 190 de 128x128 píxeles cada uno, y se trabajó con un algoritmo que mide la evolución de la velocidad.

A partir de los parámetros evaluados y seleccionados previamente, a continuación se presentan los gráficos de la varianza promedio de la velocidad del “biospeckle” (promedio \pm DE) para evaluar la motilidad parasitaria, en una escala del 1 al 10 para facilitar la interpretación. Se seleccionaron las categorías L3 muertas (con estufa a 50 grados), L3 con 2 $\mu\text{g/mL}$ de LEV, L3 con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LEV y L3 vivas (sin LEV). En la Fig. III.2 se puede observar los resultados de medir 6 veces la misma muestra para cada categoría (“Réplicas”), las cuales se realizaron para evaluar la reproducibilidad de los resultados. Sólo se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) al comparar la categoría L3 muertas con L3 con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LEV o L3 vivas, pero no así al comparar las L3 incubadas con 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ de LEV ($P > 0.05$).

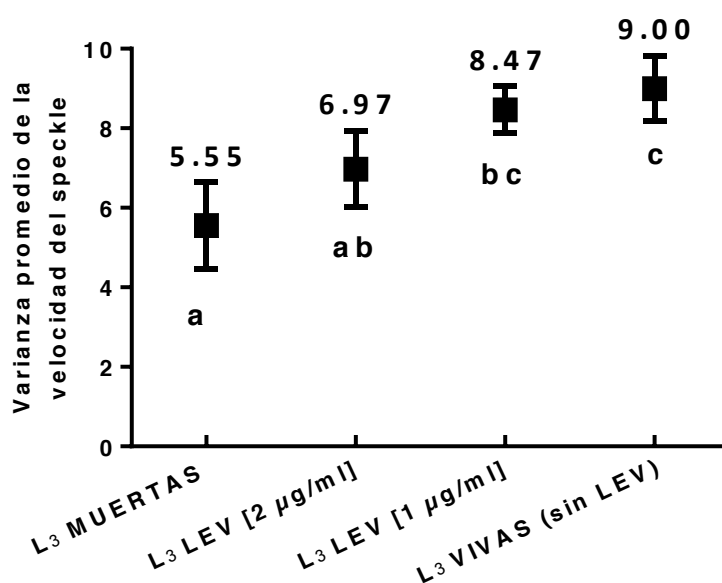


Figura III.2. “Réplicas”. Varianza promedio de la velocidad del “biospeckle” (promedio \pm DE) luego de medir 6 veces la misma muestra para cada categoría evaluada (L3 muertas, L3 con 2 $\mu\text{g/mL}$ de LEV, L3 con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LEV y L3 vivas sin LEV). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Por otro lado, en la Fig. III.3 se observan los resultados de medir 6 muestras para cada categoría (medidas una vez cada una) (“Muestras”). En este caso los desvíos estándares son más elevados, situación que era de esperarse por ser diferentes muestras, la cual sería la situación más real pensando en la aplicabilidad futura del “biospeckle”. A diferencia de la medición “Réplicas” en la cual se encontraron mayores diferencias entre las diferentes categorías evaluadas, en el caso de

medir 6 muestras diferentes para cada categoría (Fig. III.3), sólo difieren estadísticamente L3 muertas de L3 vivas ($P < 0.05$).

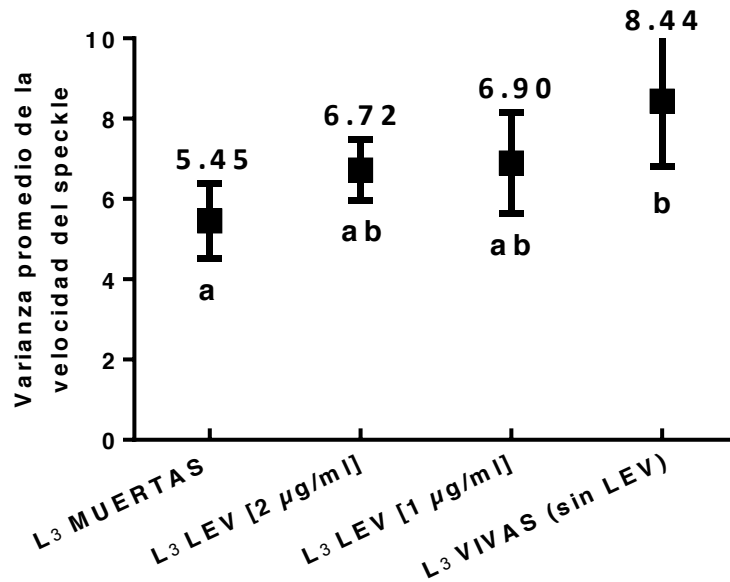


Figura III.3. “Muestras”. Varianza promedio de la velocidad del “biospeckle” (promedio \pm DE) luego de medir 6 muestras (una vez cada una) para cada categoría evaluada (L3 muertas, L3 con 2 $\mu\text{g/mL}$ de LEV, L3 con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LEV y L3 vivas sin LEV). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

III.1.2 Evaluación de la motilidad parasitaria a través de la observación directa de *H. contortus* adultos

Objetivo

Evaluar la motilidad parasitaria a través de la observación directa de ejemplares adultos de *H. contortus* susceptibles y resistentes al antihelmíntico IVM.

Diseño y metodología

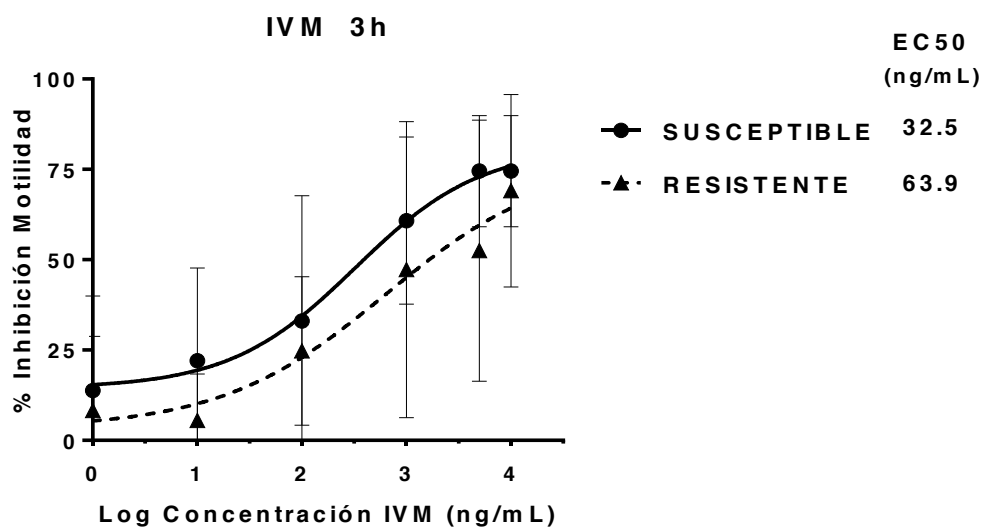
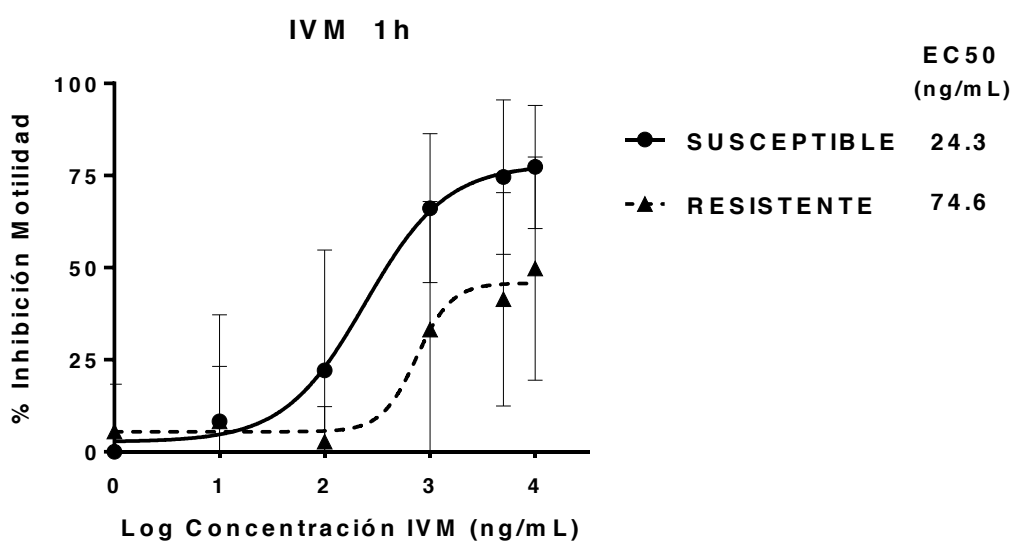
Para el presente trabajo se utilizaron ejemplares adultos de *H. contortus* susceptibles y resistentes a IVM. Se incubaron en medio RPMI (RPMI-1640 Sigma-aldrich, St Louis, MO, USA) dichos ejemplares (37°C, 5% CO₂), y con diferentes concentraciones de IVM (distribuidos en 4 wells de placas de cultivo celular de 12 wells con 3 ejemplares por well, por lo que se trabajó con n=12 *H. contortus* por concentración evaluada). Las concentraciones de IVM utilizadas fueron 1, 10, 100, 500 y 1000 ng/mL. Simultáneamente se evaluaron ejemplares adultos sin IVM como grupo control (n=12). Se evaluó la motilidad parasitaria por observación directa, durante 10 segundos por well, sobre platina térmica (37°C) a las 1, 3, 24 y 48 hs post-inicio de incubación. Se realizó el mismo procedimiento tanto para el aislamiento susceptible como para el resistente. La escala utilizada fue de 1 a 4, siendo: 1, sin movimiento; 2, muy poco movimiento (esporádico, lento y de una parte del cuerpo del parásito); 3, poco movimiento (pero todo el cuerpo) y 4, movimiento normal. Para graficar los resultados de manera más representativa se transformó la escala numérica en porcentajes (%) de inhibición de motilidad, por lo que el valor 1 (sin movimiento) se corresponde con 100% de inhibición mientras que el valor 4 (movimiento normal) se corresponde con 0% inhibición. A partir de los datos de motilidad obtenidos se construyeron las curvas dosis-respuesta y se calculó la EC₅₀ (concentración de fármaco que produce el 50% del efecto máximo) para cada hora de observación.

El análisis estadístico se realizó con el programa InStat (versión 3.0, GraphPad Software, San Diego, California, EEUU), en el cual se realizó un análisis no paramétrico (Mann Whitney). Para la construcción de las curvas dosis-respuesta se realizó una regresión no lineal (sigmoideal dose-response, Graph Pad Prism6).

Resultados

A continuación se presentan las curvas dosis-respuesta obtenidas para los aislamientos de *H. contortus* susceptible y resistente, en la cuales se puede observar la inhibición de la motilidad (0 a 100%) en función de la concentración de IVM (0 a 1000 ng/mL). Se logró evaluar la motilidad parasitaria a través de la observación directa de ejemplares adultos de *H. contortus*, aunque sólo se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre ambos aislamientos parasitarios (susceptible y resistente) tras 1 h de incubación, y sólo entre el control y las altas concentraciones de IVM (500 y 1000 ng/mL). En cambio, tanto para las concentraciones más

bajas a la hora de incubación como a las 3, 24 y 48 hs de incubación para todas las concentraciones evaluadas, no se encontraron diferencias estadísticas ($P>0.05$) en los valores de motilidad obtenidos al comparar ambos aislamientos de *H. contortus*. Se muestra en cada gráfico los valores de EC50 correspondientes a cada aislamiento. Si bien en general los valores de EC50 correspondientes al aislamiento resistente fueron mayores que los observados para el aislamiento susceptible, estas diferencias en ningún caso alcanzaron diferencias significativas. Por otro lado, a partir de las 24 h de incubación los resultados obtenidos evidenciaron una elevada variabilidad.



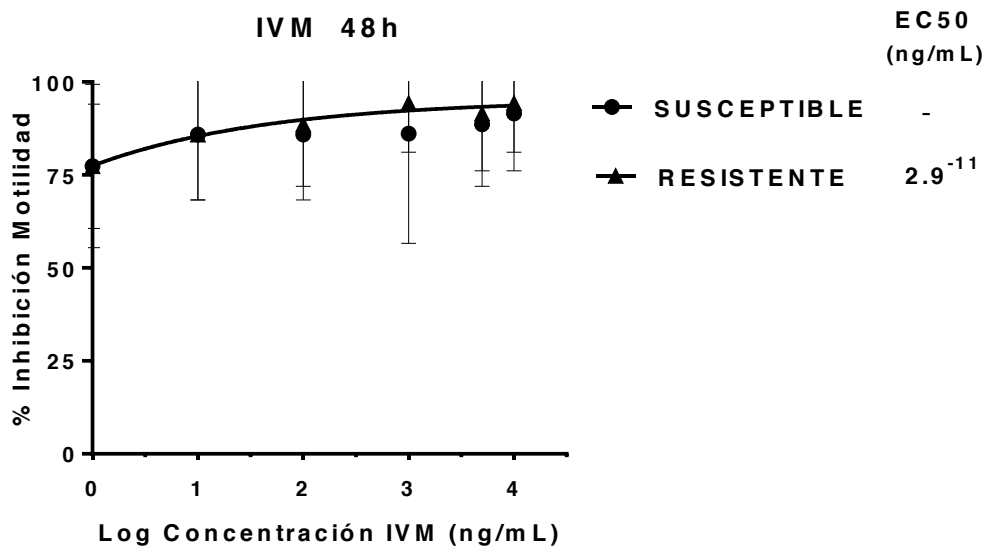
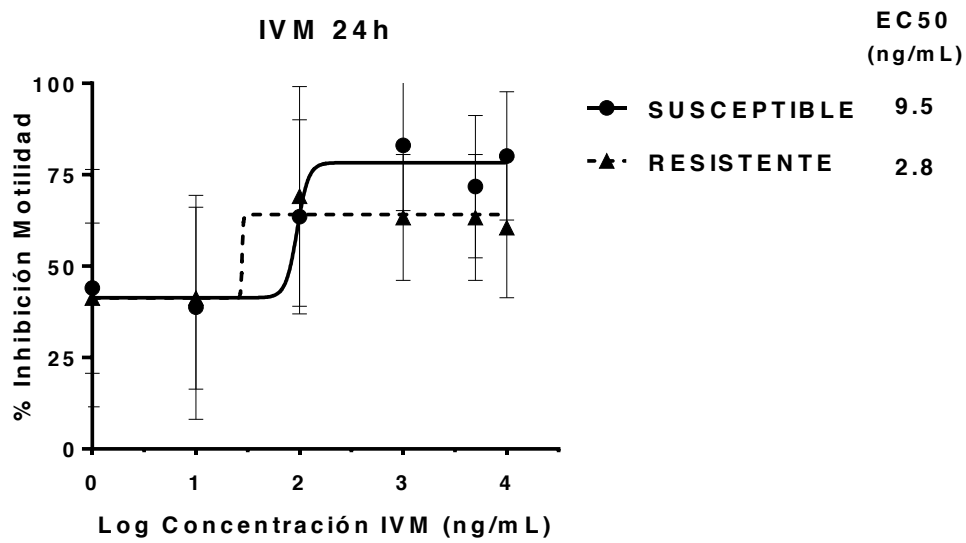


Figura III.4. Curvas dosis-respuesta para ivermectina con aislamientos susceptible y resistente de *H. contortus*, correspondiendo cada curva a un tiempo diferente de incubación (1h, 3h, 24h y 48h). Cada punto representa el promedio \pm desvío estándar, n=12.

Discusión (Línea de Investigación I)

El objetivo general de la presente Línea de Investigación fue poner a punto una técnica *ex vivo* que permita estudiar la actividad farmacológica de diferentes moléculas antihelmínticas. Esta actividad se evaluó sobre diferentes estadios parasitarios, definiendo la motilidad como variable indicadora (directa o indirecta) de efecto. Para ello, se probaron dos técnicas diferentes, la técnica de “biospeckle” (utilizando L3 de *H. contortus*) o por observación directa (utilizando ejemplares adultos de *H. contortus*).

Desde hace varios años se están evaluando alternativas a las técnicas *in vivo* para la detección de nematodos resistentes, siendo *H. contortus* el nematodo modelo para el desarrollo de las mismas bajo condiciones *ex vivo* (Kotze y Prichard, 2016). En general éstas técnicas son más rápidas, menos costosas y evitan los efectos en los animales hospedadores en comparación a las realizadas *in vivo*. Además, las pruebas *ex vivo* permiten trabajar con un rango de concentraciones de un determinado antihelmíntico, y de esta forma describir el efecto del fármaco en la población parasitaria (por ejemplo con la concentración del fármaco que produce el 50% del efecto máximo -EC50-) (Kotze y Prichard, 2016). A nivel mundial se han desarrollado diferentes técnicas que evalúan los efectos de los antihelmínticos sobre la motilidad parasitaria, y es en este contexto en el cual se evaluó la posibilidad de adaptar y utilizar las mismas con el fin de evaluar las potenciales interacciones entre fármacos nematocidas de diferente mecanismo de acción.

Considerando algunos resultados prometedores disponibles en la bibliografía, los cuales en su gran mayoría estuvieron dirigidos a la detección de aislamientos resistentes a través de la evaluación de la motilidad parasitaria, en la presente Tesis Doctoral se trabajó con la técnica de “biospeckle” como así también con la observación directa. Gill *et al.* (1991) lograron diferenciar *H. contortus* susceptibles de resistentes a través de la observación directa de la motilidad de L3 con microscopio. Con el objetivo de estudiar el efecto de los fármacos directamente sobre los parásitos a los cuales se dirige el tratamiento, en la presente Tesis se logró evaluar la motilidad parasitaria en especímenes adultos de *H. contortus*. Sin embargo, a diferencia de los resultados reportados por Gill *et al.* (1991) con L3, no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los aislamientos susceptible y resistente a IVM (*Experimento III.1.2*). Una de las posibles explicaciones es la alta variabilidad de movimiento que se observa entre los nematodos que se encuentran bajo las mismas condiciones de incubación (tanto en presencia como en ausencia de fármaco), la cual se refleja en los altos desvíos estándares de los valores de motilidad parasitaria observados. Además, la principal desventaja de la observación directa de la motilidad es su alto nivel de subjetividad (Gill *et al.*, 1991; Hansen *et al.*,

2014), por lo tanto no sería una técnica práctica para su aplicación más allá de la fase experimental (Buckingham *et al.*, 2014).

Considerando las limitaciones de la observación directa, se han desarrollado varios instrumentos automáticos para medir el movimiento de los nematodos. Bennett y Pax (1986) desarrollaron una de las primeras herramientas para medir motilidad parasitaria similar al “biospeckle” descrito en esta Tesis, pero realizaron las mediciones con otros géneros de nematodos. Folz *et al.* (1987) utilizaron el mismo instrumento (que mide la desviación de la luz al pasar por los parásitos en movimiento) con *H. contortus* obteniendo resultados que permitían medir el efecto de los antihelmínticos IVM, ABZ y LEV sobre la motilidad parasitaria de L3, ya que reportaron diferencias estadísticas entre las diferentes concentraciones evaluadas. Sin embargo, al igual que con la técnica de “biospeckle” descrita en la presente Tesis, no lograron diferenciar, a través de la motilidad, L3 sin LEV con L3 incubadas con 1µg/mL de LEV. Luego, con el mismo instrumento de medición (Folz *et al.*, 1987), Coles, Folz y Tritschler II (1989) lograron diferenciar aislamientos susceptibles de resistentes a ABZ e IVM a través de la evaluación de la motilidad de L3 de *H. contortus*. En general se intenta trabajar con el estadio L3, ya que es el más fácil de obtener en grandes cantidades a partir de los coprocultivos. En los últimos años se han desarrollado instrumentos más especializados para evaluar el efecto de los antihelmínticos sobre la motilidad parasitaria de L3 (Pomarico *et al.*, 2004; Smout *et al.*, 2010; Storey *et al.*, 2014). A pesar de las nuevas tecnologías, Miller *et al.* (2015) demostraron que la inhibición de la motilidad del estadio L3 de nematodos GI es un fenotipo pobre para evaluar resistencia antihelmíntica, ya que no encontraron diferencias estadísticas entre neamtodos susceptible y resistente a lactonas macrocíclicas. En forma similar, los resultados obtenidos con el “biospeckle” utilizado en la presente Tesis demuestran que sólo se logró diferenciar L3 muertas de L3 vivas (sin antihelmíntico) a través de la motilidad parasitaria. Sin embargo, el rango de motilidad obtenido entre L3 muertas y vivas fue muy reducido, razón que sumada a la variabilidad, determinó que no fuera posible discriminar el efecto de diferentes concentraciones de antihelmíntico.

En conclusión, bajo las condiciones experimentales descritas, la técnica de “biospeckle” no resultó útil para estudiar la actividad de diferentes fármacos antihelmínticos sobre la motilidad de L3. Esto puede deberse a la insuficiente puesta a punto, o, en línea con los hallazgos reportados por Miller *et al.* (2015), a que la motilidad parasitaria no es un parámetro lo suficientemente sensible y exacto para estudiar la actividad de diferentes fármacos, ya sea para diferenciar parásitos susceptibles de resistentes, como para evaluar interacciones farmacodinámicas entre ellos.

III.2 Línea de Investigación 2: Acumulación de fármacos en parásitos susceptibles y resistentes

Introducción

Existe una estrecha relación entre el comportamiento farmacocinético de un antihelmíntico y su actividad antiparasitaria. En este sentido, se ha alcanzado un importante progreso en la comprensión de los procesos que gobiernan la distribución del fármaco/metabolito activo hacia los sitios de localización parasitaria y la acumulación de los mismos en los parásitos más importantes de los rumiantes (Alvarez *et al.*, 1999; Alvarez *et al.*, 2000, 2012; Lifschitz *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2007; Lloberas *et al.*, 2012). Hoy sabemos que las características físico-químicas de un fármaco determinan en gran medida su distribución a los tejidos/fluidos donde se encuentran los parásitos y definen el mecanismo de acumulación en los mismos (cestodos, trematodos y nematodos) (Alvarez *et al.*, 1999; Alvarez *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2007). Es así que aún para parásitos nematodos que se alimentan por vía oral, la difusión simple a través de la superficie externa (cutícula) es el principal mecanismo de entrada de fármacos (Mottier *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2007). La situación originalmente descrita en parásitos susceptibles, puede diferir sustancialmente en presencia de parásitos resistentes. Dentro de los mecanismos inespecíficos de resistencia, se encuentran aquellos que operan reduciendo la acumulación del antihelmíntico dentro de las células parasitarias. En consecuencia, nunca se alcanza un “nivel tóxico” del fármaco en la biofase (“ambiente” que rodea al receptor específico) y el parásito resiste la dosis terapéutica del fármaco. Mecanismos inespecíficos parecen mediar la resistencia a fármacos endectocidas (Xu *et al.*, 1998) y, en menor medida, a BZD (Blackhall *et al.*, 2008). En este contexto, cobra importancia estudiar el proceso de acumulación de fármacos en parásitos susceptibles y resistentes, estudiando además el efecto que sobre dicha acumulación pudieran tener la co-administración con otros antihelmínticos y/o fármacos inhibidores del metabolismo/transportadores de membrana.

Experimentos

III.2.1 Acumulación de antihelmínticos en *H. contortus* susceptibles y resistentes

Objetivo

Estudiar la acumulación bajo condiciones *ex-vivo* de IVM y ABZSO en ejemplares adultos de *H. contortus* susceptibles y resistentes a dichos fármacos.

Diseño y metodología

H. contortus susceptibles y resistentes a IVM y BZD fueron recuperados de ovinos infectados en forma artificial. Los parásitos adultos (5 réplicas por concentración y por aislamiento, de 0,1g cada una) fueron incubados en medio RPMI en presencia de ABZSO (5 nmol/mL) o IVM (5 ng/ mL) a 37°C y 5% de CO₂. Se utilizaron diferentes tiempos de incubación, entre 1 y 24 horas. Luego de cada tiempo de incubación los parásitos fueron lavados, secados y procesados para la cuantificación del fármaco por HPLC. La metodología analítica utilizada fue la descrita en la sección II.2.

Las concentraciones alcanzadas fueron comparadas estadísticamente utilizando el programa InStat (versión 3.0, GraphPad Software, San Diego, California, EEUU), en el cual se realizó un análisis paramétrico (Test-t). Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de $P < 0.05$. Los gráficos se realizaron con el software Graph Pad Prism6.

Resultados

En la figura III.5 se puede observar la acumulación total de IVM en 0.1g de *H. contortus* susceptible y resistente incubados durante una hora con 5 ng/mL de IVM. Se cuantificaron concentraciones de IVM significativamente ($P < 0.05$) menores en los parásitos resistentes.

IVERMECTINA 1 hora incubación		
Aislamiento <i>H. contortus</i>	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE
Concentración (ng/0,1g <i>H.contortus</i>)	2.81^a ± 0.68	1.43^b ± 0.49

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

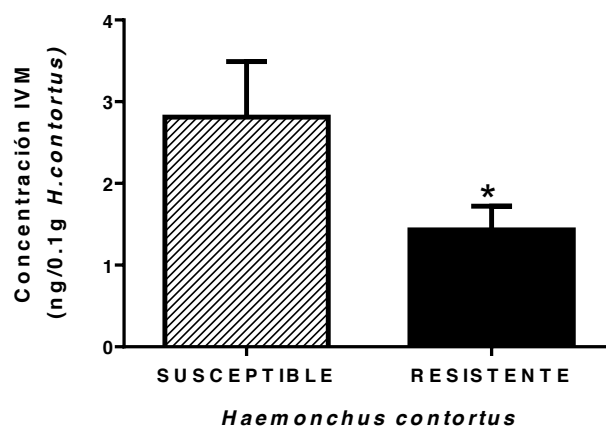


Figura III.5. Cantidad total (media ± DE) de ivermectina (IVM) en *H. contortus* susceptible y resistente incubados en presencia de IVM (5 ng/mL) por 1 hora. * Diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

En contraste con los resultados obtenidos luego de 1 hora de incubación; luego de 4 hs de incubación no se observaron diferencias estadísticas (P>0.05) entre parásitos susceptibles y resistentes en la cantidad total de IVM recuperada (0.1g de *H. contortus*) (Fig. III.6).

IVERMECTINA 4 horas incubación		
Aislamiento <i>H. contortus</i>	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE
Concentración (ng/0,1g <i>H.contortus</i>)	2.82 ± 0.58	2.69 ± 0.72

(P>0.05)

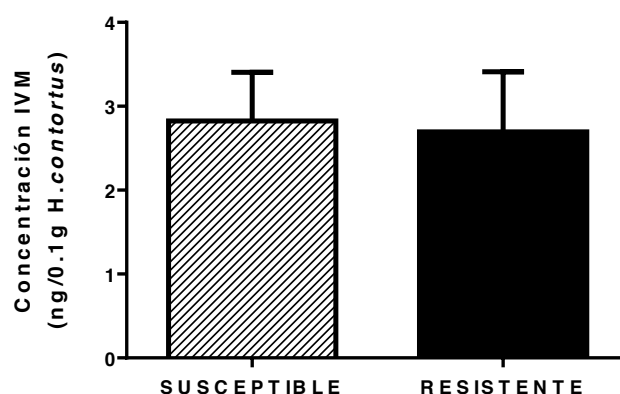


Figura III.6. Cantidad total (media ± DE) de ivermectina (IVM) en *H. contortus* susceptible y resistente incubados en presencia de IVM (5 ng/mL) por 4 horas.

La figura III.7 muestra la acumulación total de IVM entre *H. contortus* susceptibles y resistentes luego de 6 hs de incubación. En forma similar a los resultados obtenidos tras 4 hs de incubación con

IVM (5 ng/mL), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) entre *H. contortus* susceptibles y resistentes.

IVERMECTINA 6 horas incubación		
Aislamiento <i>H. contortus</i>	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE
Concentración (ng/0,1g <i>H. contortus</i>)	3.68 ± 0.91	2.27 ± 1.06

($P>0.05$)

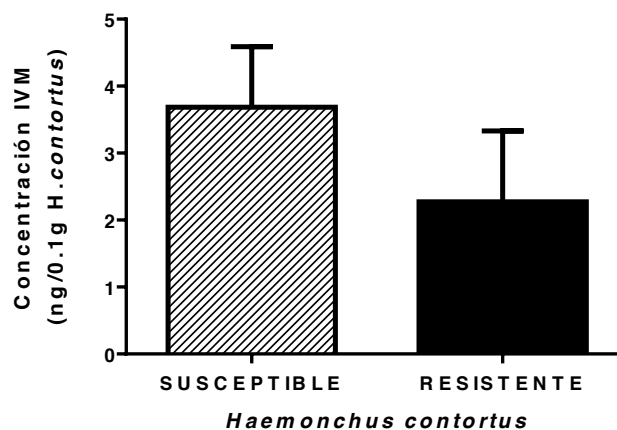


Figura III.7. Cantidad total (media ± DE) de ivermectina (IVM) en *H. contortus* susceptible y resistente incubados en presencia de IVM (5 ng/mL) por 6 horas.

En coincidencia con el resultado obtenido tras 1 hora de incubación, luego de 24 hs de incubación, la concentración obtenida en el aislamiento resistente (2.02 ng/0,1g *H. contortus*) fue significativamente menor ($P<0.05$) al obtenido para el aislamiento susceptible (6.38 ng/0,1g *H. contortus*) (Fig. III.8).

IVERMECTINA 24 horas incubación		
Aislamiento <i>H. contortus</i>	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE
Concentración (ng/0,1g <i>H.contortus</i>)	6.38 ^a ± 2.25	2.02 ^b ± 0.92

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

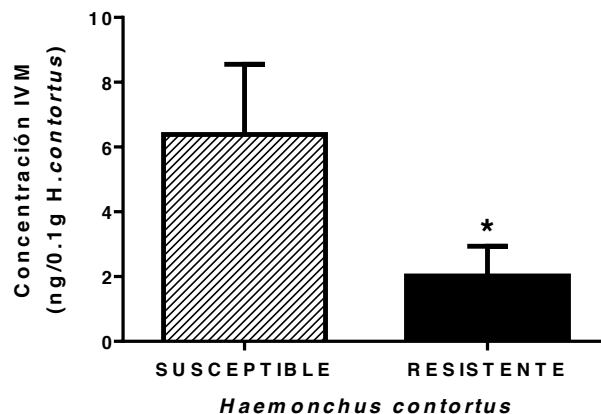


Figura III.8. Cantidad total (media ± DE) de ivermectina (IVM) en *H. contortus* susceptible y resistente incubadas en presencia de IVM (5ng/mL) por 24 horas. * Diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Con respecto a la incubación de nematodos adultos de *H. contortus* en ABZSO, de manera similar a lo obtenido luego de la incubación con IVM (Fig. III.5), luego de 1 hora de incubación (5 nmol/mL), se cuantificaron concentraciones de ABZSO significativamente menores en los parásitos resistentes (P<0.05) comparados con los susceptibles (Fig. III. 9).

ABZSO 1 hora incubación		
Aislamiento <i>H. contortus</i>	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE
Concentración (µg/0,1g <i>H.contortus</i>)	0.15 ^a ± 0.01	0.07 ^b ± 0.01

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

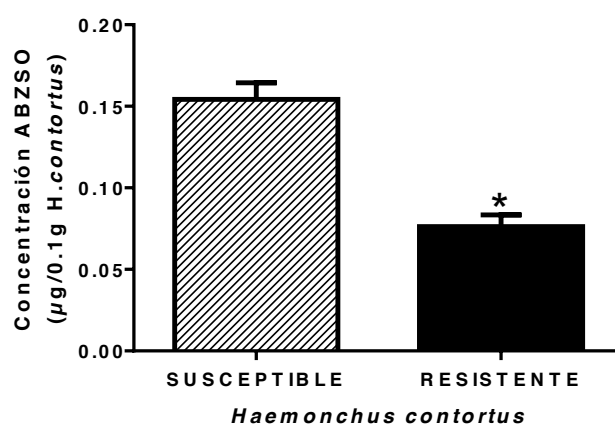


Figura III.9. Cantidad total (media ± DE) de albendazole sulfóxido (ABZSO) en *H. contortus* susceptible y resistente incubados en presencia de ABZSO (5 nmol/mL) por 1 hora. * Diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

III.2.2 Acumulación de antihelmínticos: efecto de su uso combinado en parásitos resistentes

Objetivo

Estudiar las potenciales interacciones farmacocinéticas a nivel parasitario de IVM y ABZSO en ejemplares adultos de *H. contortus* resistentes a dichos fármacos

Diseño y metodología

De manera similar a lo previamente descrito, ejemplares adultos de *H. contortus* resistentes a IVM y ABZSO fueron incubados en presencia de IVM (5 ng/mL) y ABZSO (5 nmol/mL) en forma combinada durante 1, 6 y 24 hs (5 réplicas por aislamiento, de 0,1g material parasitario por réplica). Al igual que en el experimento anterior, los parásitos adultos fueron incubados a 37°C y con 5% de CO₂. Luego de cada tiempo de incubación los parásitos fueron lavados, secados y procesados para la cuantificación del fármaco por HPLC. La metodología analítica utilizada fue la descrita en la sección II.2.

Las concentraciones alcanzadas por cada molécula fueron comparadas estadísticamente con las alcanzadas cuando cada molécula fue administrada sola. Para el análisis estadístico se utilizó el programa InStat (versión 3.0, GraphPad Software, San Diego, California, EEUU), en el cual se realizó un análisis paramétrico (Test-t). Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de P<0.05. Los gráficos se realizaron con el software Graph Pad Prism6. Se buscó determinar la potencial interacción a nivel parasitario de tal forma que una molécula pueda modificar (incrementar o disminuir) la acumulación intraparasitaria de la otra.

Para llevar a cabo el objetivo del presente experimento se había propuesto cuantificar la acumulación de ambas moléculas utilizadas en la incubación (IVM y ABZSO) de manera individual ya que ambas moléculas se detectan por métodos cromatográficos diferentes. Sin embargo, limitaciones en la cantidad de material parasitario disponible para los experimentos determinó que solo pudiera realizarse la cuantificación de IVM en el mismo.

Resultados

La figura III.10 muestra la acumulación total de IVM en *H. contortus* resistentes incubados solo con IVM o co-incubados con IVM+ABZSO. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de IVM en los parásitos, luego de su incubación con IVM o IVM+ABZSO ($P>0.05$).

IVERMECTINA 1 hora incubación		
Aislamiento <i>H. contortus</i>	RESISTENTE	
GRUPO	IVM	IVM+ABZSO
Concentración (ng/0,1g <i>H. contortus</i>)	1.43 ± 0.29	1.43 ± 0.39

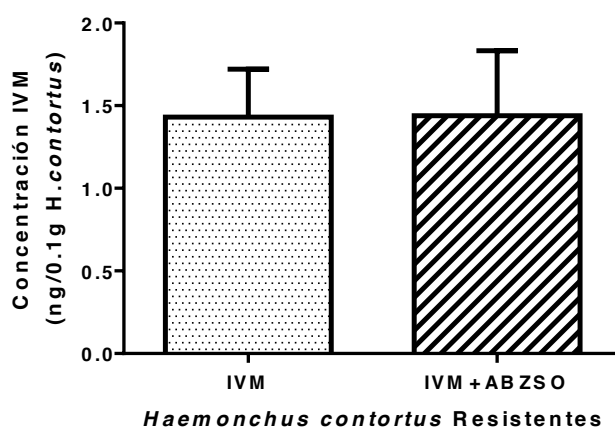


Figura III.10. Cantidad total (media ± DE) de ivermectina (IVM) en *H. contortus* resistentes luego de su incubación con IVM sola (5 ng/mL) o combinada con albendazole sulfóxido (ABZSO; 5 nmol/mL) por una hora.

Sin embargo, cuando los parásitos se incubaron durante 6 hs, la cantidad total de IVM recuperada fue significativamente mayor ($P<0.05$) en aquellos co-incubados con ABZSO (Fig. III.11)

IVERMECTINA 6 horas incubación		
Aislamiento <i>H. contortus</i>	RESISTENTE	
GRUPO	IVM	IVM+ABZSO
Concentración (ng/0,1g <i>H.contortus</i>)	2.27 ^a ± 1.06	5.04 ^b ± 1.64

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

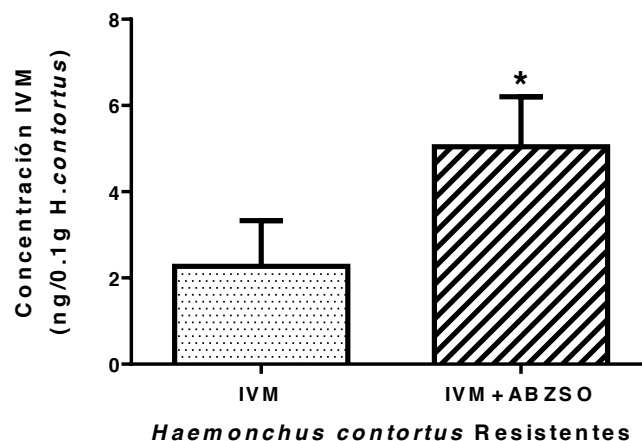


Figura III.11. Cantidad total (media ± DE) de ivermectina (IVM) en *H. contortus* resistentes luego de su incubación con IVM sola (5 ng/mL) o combinada con albendazole sulfóxido (ABZSO; 5nmol/mL) por 6 horas. * Diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

En la misma línea que lo observado a las 6 horas de incubación, en la Fig. III.12 se puede observar una mayor (P<0.05) acumulación de IVM en nematodos adultos incubados por 24 horas con IVM+ABZSO, en comparación a la observada en parásitos incubados solo con IVM.

IVERMECTINA 24 horas incubación		
Aislamiento <i>H. contortus</i>	RESISTENTE	
GRUPO	IVM	IVM+ABZSO
Concentración (ng/0,1g <i>H.contortus</i>)	2.02 ^a ± 0.91	4.65 ^b ± 1.47

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

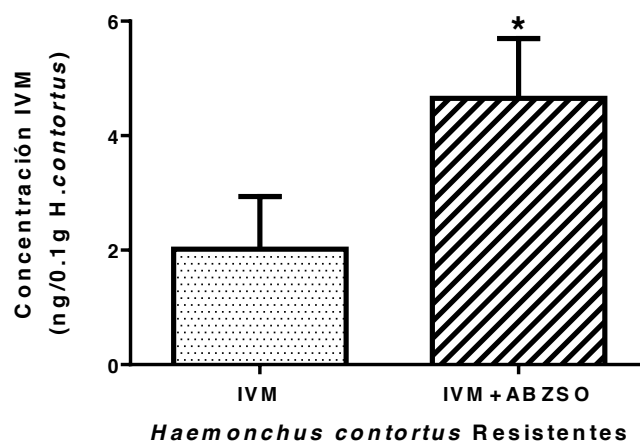


Figura III.12. Cantidad total (media ± DE) de ivermectina (IVM) en *H. contortus* resistentes luego de su incubación con IVM sola (5 ng/mL) o combinada con albendazole sulfóxido (ABZSO) (5 nmol/mL) por 24 horas. * Diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Discusión (Línea de Investigación II)

El principal objetivo de la *Línea de Investigación II* fue estudiar la acumulación *ex vivo* de antihelmínticos en ejemplares adultos de *H. contortus* susceptibles y resistentes a dichos fármacos. Los resultados obtenidos en el *Experimento III.2.1* se complementaron con los obtenidos en el siguiente estudio, cuyo objetivo fue evaluar las potenciales interacciones farmacocinéticas a nivel parasitario en *H. contortus* resistentes.

Aunque los fármacos antihelmínticos pueden ingresar a los parásitos por ingestión oral o por pasaje transcuticular (Geary *et al.*, 1995), la bibliografía demuestra que la entrada transcuticular es la más importante para el ingreso de antihelmínticos a los nematodos (Ho *et al.*, 1990; Geary *et al.*, 1995). De esta forma, se pueden llevar a cabo experimentos como las incubaciones con antihelmínticos realizadas en la presente Tesis con el fin de evaluar la acumulación de los fármacos dentro de los nematodos. En todos los tiempos de incubación evaluados (1, 4, 6 y 24 hs) se encontró menor cantidad total de IVM en el aislamiento de *H. contortus* resistente. La sobreexpresión de la glicoproteína de permeabilidad de membrana (Gp-P) ha sido propuesto como un mecanismo de resistencia a IVM en nematodos (Xu *et al.*, 1998). La sobreexpresión de Gp-P favorecería el eflujo de fármaco desde el interior parasitario, evitando la acumulación intraparasitaria del mismo y su efecto deletéreo sobre el parásito. Varios autores reportan aumentos en la expresión de Gp-P en nematodos resistentes recuperados de corderos tratados con lactonas macrocíclicas en comparación a los recuperados de animales control sin tratamiento (Prichard y Roulet, 2007; Lloberas *et al.*, 2013). De esta forma, una sobreexpresión de Gp-P en los nematodos resistentes permitiría eliminar el fármaco del parásito, limitando su acumulación en el mismo. A 1 y 24 hs de incubación con IVM, se evidenciaron diferencias significativas en la acumulación de IVM entre *H. contortus* susceptibles y resistentes a dicho antihelmíntico ($P < 0.05$), cuantificándose menores concentraciones en los nematodos resistentes. Sin embargo, si bien se mantiene una tendencia, no se observaron diferencias significativas a las 4 horas y a las 6 hs de incubación entre ambos aislamientos parasitarios. Esto podría explicarse en parte por la variabilidad observada particularmente en estos tiempos de incubación. Es posible que dichas diferencias alcancen significancia estadística a partir del análisis de un mayor número de réplicas. En un estudio reciente (Maté *et al.*, 2017) se demostró que el incremento de expresión de Gp-P 2 en *H. contortus* resistentes a IVM era tiempo dependiente. La expresión de dicha Pg-P aumentó un 181%, 200% y 248% en parásitos recuperados de ovinos tratados con IVM, a las 6, 12 y 24 hs post-tratamiento, respectivamente. Estos resultados parecen indicar un incremento de

la expresión relacionado con el tiempo de contacto fármaco-parásito. De manera similar, en el experimento *ex vivo* realizado en la presente Tesis, la mayor diferencia en la acumulación de IVM entre parásitos susceptibles y resistentes se observó a las 24 horas de incubación (6.38 y 2.02 ng/0,1g *H. contortus* en parásitos susceptibles y resistentes, respectivamente). Por lo tanto, los resultados obtenidos en la presente Tesis se corresponden con uno de los potenciales mecanismos de resistencia a IVM en *H. contortus* postulados.

En forma similar a los resultados reportados para IVM, significativamente menores ($P < 0.05$) concentraciones de ABZSO fueron cuantificadas en *H. contortus* resistente (1 hora de incubación). Nuevamente, un incremento del eflujo así como un aumento en el metabolismo del antihelmíntico podrían explicar la menor acumulación de ABZSO en los *H. contortus* resistentes (Kerboeuf *et al.*, 2003; Wolstenholme *et al.*, 2004). A pesar que los BZD tienen menor afinidad por las proteínas de membrana Gp-P, Blackhall *et al.*, (2008) sugieren que el eflujo mediado por la Gp-P también podría ser un mecanismo de resistencia a los BZD en *H. contortus*. De hecho, ABZSO ha sido descrito como sustrato de la Pg-P (Merino *et al.*, 2005).

En el contexto de la resistencia antihelmíntica, se ha propuesto el uso de combinaciones de antiparasitarios como estrategia para retrasar el desarrollo de la misma (Bartram *et al.*, 2012). Al administrar en forma simultánea dos fármacos antihelmínticos pueden darse potenciales interacciones a nivel parasitario, de tal forma que una molécula pueda modificar (incrementar o disminuir) la acumulación intraparasitaria de la otra. De hecho, la cantidad total de IVM cuantificada en *H. contortus* resistente se vio modificada luego de la co-incubación con ABZSO. La cantidad total de IVM recuperada fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los nematodos adultos co-incubados con ABZSO en comparación a los incubados con IVM sola a las 6 y 24 hs. Como fuera mencionado anteriormente, dado que IVM y ABZSO son sustratos de la Gp-P (Xu *et al.*, 1998; Merino *et al.*, 2005) una interacción a este nivel podría explicar el incremento en la cantidad total de IVM en ejemplares adultos de *H. contortus* observado tras su incubación en forma combinada. Por lo tanto, las modificaciones farmacocinéticas observadas podrían basarse en una interacción fármaco-fármaco a nivel de transportadores de eflujo. Si bien estos resultados derivan de estudios *ex vivo*, es posible que una situación similar pueda darse *in vivo*, de forma tal que la presencia de ABZSO tras un tratamiento combinado incremente las concentraciones intraparasitarias de IVM. El impacto que esto tendrá en la eficacia final del tratamiento combinado dependerá de las concentraciones que cada fármaco alcance en la biofase del parásito, el tiempo de contacto de los mismos, la expresión de transportadores de membrana en cada individuo y el rol que estos transportadores tengan en la detoxificación final del fármaco a nivel parasitario.

CAPÍTULO IV: SECCIÓN EXPERIMENTAL II
(estudios *in vivo*)

El objetivo general de la presente Sección Experimental fue evaluar las posibles interacciones farmacodinámicas y/o farmacocinéticas que pueden ocurrir al co-administrar fármacos antiparasitarios (nematodicidas) de diferentes grupos químicos (combinaciones antihelmínticas) en bovinos (estudios *in vivo*).

IV. Línea de Investigación 3: Combinaciones de antihelmínticos en bovinos

Introducción

La parasitosis GI es una de las enfermedades que mayor impacto económico ocasiona en los sistemas pastoriles de producción de carne a nivel mundial (Charlier *et al.*, 2015), principalmente por afectar la ganancia de peso en los terneros de invernada. Por lo tanto, el control parasitario es necesario para asegurar buenos niveles productivos en dichos sistemas. El uso inadecuado de fármacos antihelmínticos utilizados para dicho control, entre otros factores, han llevado al escenario actual de resistencia antihelmíntica, considerada uno de los problemas principales de la medicina veterinaria en la actualidad (Kaplan y Vidyashankar, 2012). Si bien se han obtenido resultados preliminares prometedores con diferentes estrategias no químicas utilizadas para el control parasitario (control biológico, vacunas, etc.), estas tecnologías por lo general aún no están disponibles para su uso comercial. Por tal razón, el uso de fármacos antihelmínticos continúa siendo una de las herramientas clave en el control parasitario, debido a su practicidad y eficacia.

Considerando que el control de parásitos en el ganado se basa en el uso de antiparasitarios, además de las dificultades que existen para el desarrollo de nuevos fármacos, es imprescindible buscar nuevas estrategias para optimizar el uso de los antihelmínticos disponibles actualmente en el mercado, tanto para minimizar las probabilidades de una falla terapéutica en el contexto de resistencia parasitaria, como para retardar el desarrollo de la misma. En este sentido, se han propuesto el uso de combinaciones de antihelmínticos que incluyan varios principios de actividad nematodicida con diferente mecanismo de acción (Anderson *et al.*, 1988; Geary *et al.*, 2012), como alternativas que aumenten la biodisponibilidad del antihelmíntico en el sitio activo, como por ejemplo el aumento de la dosis (Alvarez *et al.*, 2015), diferentes vías de administración (Gopal *et al.*, 2001; Lloberas *et al.*, 2012) y eventualmente la dosificación simultánea con inhibidores de la Gp-P (Lifschitz *et al.*, 2010).

Con respecto a las combinaciones nematodocidas, su utilización se basa en que los bovinos se ven afectados por infecciones parasitarias mixtas (incluyendo diferentes géneros de parásitos GI), por lo tanto dentro de una población parasitaria pueden coexistir sub-poblaciones con resistencia individual a diferentes fármacos. De esta forma, el uso simultáneo de dos o más fármacos podría derivar en un efecto antihelmíntico “cruzado” a partir del cual se logre un efectivo control parasitario. No obstante, es escasa la información disponible sobre las potenciales interacciones farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo, eliminación) y/o farmacodinámicas (unión a receptores o sitios de acción en el parásito blanco y su consecuente efecto farmacológico) que pueden ocurrir entre los principios activos de las diferentes formulaciones empleadas y que obviamente, podrían afectar el resultado final de un tratamiento. Las combinaciones nematodocidas, de uso común en Nueva Zelanda y Australia, aparecen como un recurso que debe ser evaluado bajo diferentes escenarios para evaluar su utilidad real. Mayor información sobre posibles efectos aditivos o sinérgicos de esta co-administración de fármacos es necesaria antes de su recomendación (Entrocasso *et al.*, 2008; Anziani y Fiel, 2015). Aunque se han desarrollado varias formulaciones farmacéuticas que combinan dos o tres clases de antihelmínticos nematodocidas para pequeños rumiantes, la información disponible sobre interacciones entre antihelmínticos en el ganado bovino es limitada. Es necesario determinar los comportamientos farmacocinéticos y farmacodinámicos que pueden alterarse cuando se administran simultáneamente dos o más fármacos antihelmínticos en condiciones prácticas de uso. Por lo tanto, se requieren estudios fármaco-parasitológicos antes de que se usen combinaciones de fármacos para el control antihelmíntico en bovinos.

El fracaso en el control parasitario asociado a la resistencia antihelmíntica es una de las problemáticas que mayor impacto económico tiene en los sistemas de invernada, ya que los parásitos GI que sobreviven al tratamiento antihelmíntico pueden provocar disminución en la ganancia de peso de los terneros (Fiel *et al.*, 2011; Fazzio *et al.*, 2014). Por otro lado, la falta de diagnóstico de resistencia en los establecimientos ganaderos determina que se continúen utilizando antihelmínticos inefectivos. En este contexto, es necesario evaluar el real impacto productivo de un inadecuado control parasitario asociado a la resistencia antihelmíntica, ya que es imprescindible conocer el impacto económico de esta problemática para lograr un control parasitario racional por parte de los veterinarios y productores en los establecimientos comerciales, en la búsqueda por lograr un balance adecuado entre productividad y sustentabilidad.

Experimentos

IV.1 Caracterización de potenciales interacciones farmacocinéticas farmacodinámicas para la combinación ivermectina-ricobendazole en diferentes escenarios de resistencia-susceptibilidad

IV.1.1 Objetivos

- Estudiar las posibles interacciones farmacocinéticas que pueden darse tras la administración subcutánea conjunta de IVM+RBZ en bovinos
- Comparar la eficacia clínica (TRCH) de IVM y de RBZ tras su administración SC en forma individual o combinada en diferentes escenarios que representen la situación real de la resistencia antihelmíntica en los establecimientos ganaderos comerciales de la Argentina
- Evaluar el impacto de los tratamientos en el número de huevos excretados a la pastura luego de la administración de IVM y RBZ en forma individual o combinada a terneros parasitados con nematodos resistentes a IVM.

IV.1.2 Diseño y metodología

Escenarios susceptibilidad/resistencia antihelmíntica (establecimientos ganaderos)

Con el fin de contemplar la mayor cantidad posible de escenarios posibles de susceptibilidad y resistencia antihelmíntica a IVM y RBZ se realizaron experimentos en diferentes establecimientos ganaderos comerciales con diferentes escenarios:

- *Escenario de susceptibilidad a IVM y a RBZ*
- *Escenario de nivel alto de resistencia a IVM y susceptibilidad a RBZ*
- *Escenario de nivel medio de resistencia a IVM y susceptibilidad a RBZ*
- *Escenario de nivel bajo de resistencia a IVM y susceptibilidad a RBZ*
- *Escenario de nivel bajo de resistencia a RBZ y susceptibilidad a IVM*
- *Escenario de resistencia a IVM y a RBZ*

La selección de los establecimientos comerciales se basó en reportes previos de susceptibilidad/resistencia a IVM y RBZ. Todos los establecimientos ganaderos donde se realizaron los ensayos poseían un sistema de internada de bovinos con base pastoril.

Animales experimentales

En cada ensayo se seleccionaron 60 terneros (8-10 meses de edad) naturalmente infectados con aislamientos de nematodos GI susceptibles o resistentes a IVM y a RBZ. Los animales fueron seleccionados en base al HPG, y sólo los animales con al menos 140 HPG en el día -1 fueron incluidos en el ensayo. Todos los terneros fueron caravaneados y pesados al inicio del experimento.

En cada experimento, el rodeo del cual se seleccionaron los animales se trató con LEV al ingreso y estuvo pastoreando en el establecimiento por al menos dos meses previos al inicio del ensayo. De esta forma, se aseguró que la carga parasitaria fuera nativa del cada campo donde se realizaron los diferentes experimentos con distintos escenarios. Durante la duración de cada experimento, los animales permanecieron en la misma pastura, y tuvieron agua *ad libitum*. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Animales experimentales” (Capítulo II.1.1).

Diseño experimental y tratamientos

Todos los animales parasitados (n=60) fueron ordenados según el conteo de HPG, y luego divididos en cuatro grupos experimentales (n=15), con HPG promedio similar en todos los grupos: Grupo control: los animales no recibieron tratamiento antihelmíntico; Grupo IVM sola: los animales fueron tratados por vía SC con IVM (Ivomec[®], 1% solución, Merial) a la dosis de 0.2 mg/kg; Grupo RBZ solo: los animales fueron tratados por vía SC con RBZ (Bayverm PI[®], 15% solución, Bayer o Axilur[®] PI Inyectable, 15% solución, MSD Animal Health) a la dosis de 3.75 mg/kg; Grupo IVM+RBZ: los animales fueron tratados por vía SC con IVM (Ivomec[®]) y RBZ (Bayverm PI[®] o Axilur[®]) a la dosis de 0.2 y 3.75 mg/kg, respectivamente. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Animales experimentales” (Capítulo II.1.1).

Estudio Farmacocinético

Para el estudio farmacocinético, ocho animales de cada grupo tratado (IVM, RBZ e IVM+RBZ) fueron seleccionados al azar para la obtención de muestras de sangre previo al tratamiento (tiempo 0) y a los siguientes tiempos post-tratamiento: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 hs (Grupo RBZ); 2, 4, 6, y 8 hs y 1, 3, 7, 10, 15, 21 y 28 días. Las muestras del grupo combinado (IVM+RBZ) fueron obtenidas a los mismos tiempos y días que cada grupo tratado en forma individual. En todos los grupos experimentales, las muestras de sangre fueron obtenidas utilizando tubos Vacutainers heparinizados de 10 mL (Becton Dickinson, NJ, USA). El plasma fue separado por centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos, luego colocado en tubos plásticos y almacenado a -20°C hasta el momento de su análisis por HPLC. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Cuantificación de analitos” (II.2.1).

El estudio de las posibles interacciones farmacocinéticas para la presente combinación se realizó en el “*Escenario de nivel alto de resistencia a IVM y susceptibilidad a RBZ*”.

Estudio Parasitológico

La eficacia clínica de los tratamientos fue determinada por el TRCH, para lo cual se obtuvieron muestras individuales de materia fecal de todos los animales a los 14-15 días post-tratamiento. Adicionalmente, se realizaron cultivos de materia fecal individuales y de un “pool” obtenido de cada grupo experimental, a fin de evaluar los géneros parasitarios presentes a través de la identificación de larvas (L3). Los procedimientos siguieron lo descrito en las secciones “Estudio parasitológico” (capítulo II.2.2) y “Análisis Parasitológico” (Capítulo II.3.2).

Además, en este experimento se estimó el número total de excreción de huevos de nematodos por día por los 15 animales incluidos en cada grupo experimental, basado en el peso de cada ternero, cantidad de heces excretadas por día y el conteo de HPG según Stromberg (1997). Este cálculo se realizó con los datos de cuatro establecimientos con resistencia a IVM que participaron en el presente experimento.

Análisis farmacocinético, parasitológico y estadístico de los datos

El análisis de datos siguió las pautas establecidas en el capítulo “Análisis de datos” (capítulo II.3). Los parámetros farmacocinéticos y parasitológicos para los animales de los respectivos grupos experimentales, fueron promediados y expresados como media aritmética (X) \pm desvío estándar (DE). Los parámetros farmacocinéticos se compararon estadísticamente usando la prueba t de Student. Los recuentos de HPG se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el software Instat 3.0 (Graph Pad Software, CA, EE. UU.).

IV.1.3 Resultados

La Fig. IV.1 presenta los perfiles de concentración plasmática (media \pm SD) de IVM obtenidos después de su administración subcutánea en forma única o combinada con RBZ a terneros parasitados. Los niveles plasmáticos de IVM fueron cuantificados hasta el día 28 post-tratamiento. La Tabla IV.1 resume los parámetros farmacocinéticos obtenidos para IVM luego de ambos tratamientos. La presencia de RBZ/ABZSO₂ no afectó la disposición plasmática de IVM luego de la administración SC. No se observaron diferencias estadísticas entre ambos tratamientos para todos los parámetros farmacocinéticos ($P > 0.05$).

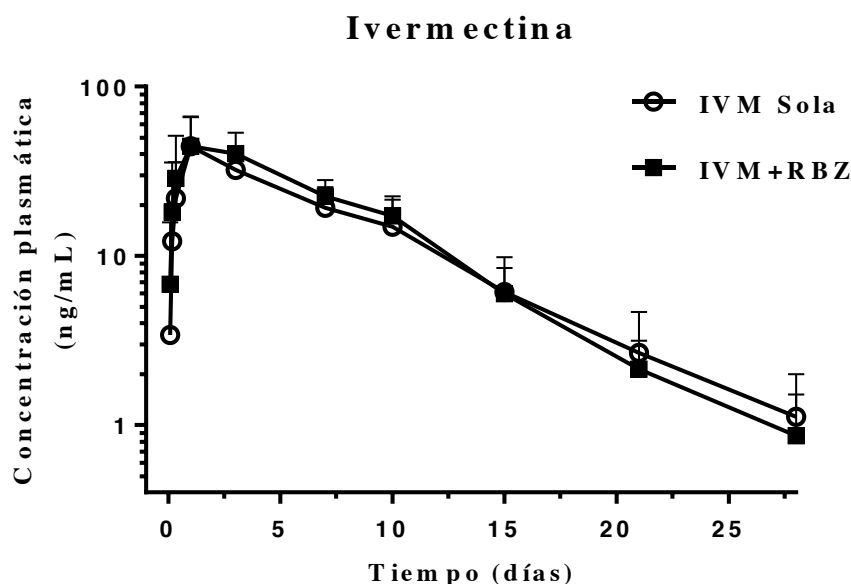


Figura IV.1. Perfiles de concentración plasmática (media \pm DE) de ivermectina (IVM) obtenidos después de su administración subcutánea en forma única (0.2 mg/kg) o combinada con ricobendazole (RBZ) (3.75 mg/kg) a terneros parasitados (n = 8).

Tabla IV.1. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos (media \pm DE) de ivermectina (IVM) obtenidos tras su administración subcutánea (0.2 mg/kg), en forma única y combinada con ricobendazole (RBZ) (3.75 mg/kg) a terneros naturalmente parasitados.

IVERMECTINA		
Parámetros Farmacocinéticos	IVM	IVM+RBZ
T_{max} (d)	1.57 \pm 0.98	1.75 \pm 1.04
C_{max} (ng/mL)	46.3 \pm 18.7	47.9 \pm 19.6
ABC_{0-LOQ} (ng.d/mL)	348 \pm 80.8	390 \pm 93.2
ABC_{0-∞} (ng.d/mL)	357 \pm 81.7	398 \pm 94.7
TMR (d)	7.58 \pm 2.81	6.95 \pm 1.28
T_{½el} (d)	4.80 \pm 1.36	4.23 \pm 0.96
T_{½abs} (d)	1.24 \pm 1.20	0.63 \pm 0.51

T_{max}: tiempo en que se obtiene la concentración plasmática máxima; **C_{max}**: concentración plasmática máxima; **ABC_{0-LOQ}**: área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 a tiempo de cuantificación; **ABC_{0-∞}**: área bajo la curva de concentración vs tiempo extrapolado al infinito; **TMR**: tiempo medio de residencia; **T_{½el}**: vida media de eliminación; **T_{½abs}**: vida media de absorción.

Ricobendazole y ABZSO₂ son los principales metabolitos recuperados en plasma después de la administración SC de RBZ. En la Fig. IV.2 se pueden observar los perfiles de concentración plasmática (media ± SD) de RBZ luego de su administración SC en forma única y co-administrado con IVM. Ésta molécula fue detectada en plasma entre las 2 y las 24 hs post-tratamiento. La Tabla IV.2 resume los parámetros farmacocinéticos plasmáticos para RBZ sólo y combinado con IVM (RBZ+IVM). No se observaron diferencias estadísticas entre ambos tratamientos ($P > 0.05$).

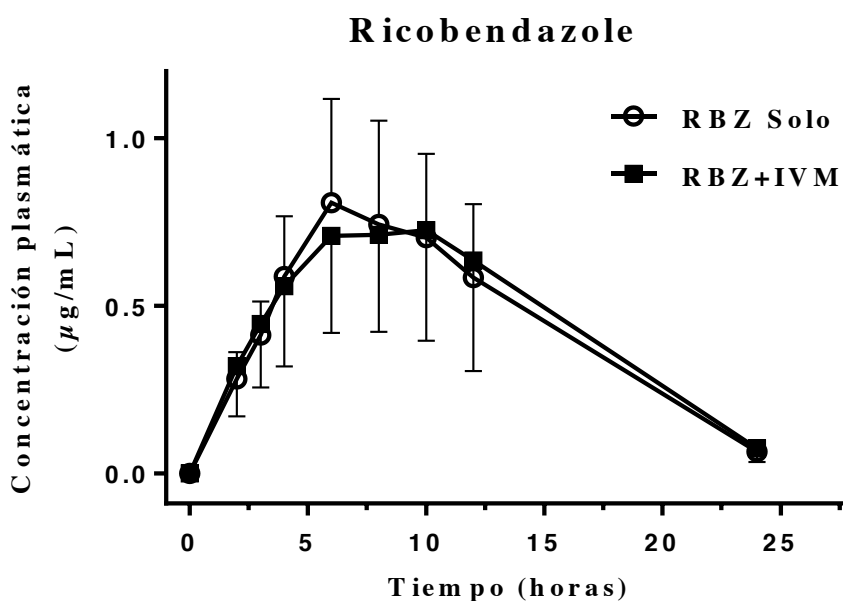


Figura IV.2. Perfiles de concentración plasmática (media ± DE) de ricobendazole (RBZ) obtenidos después de su administración subcutánea en forma única (3.75 mg/kg) o combinada con ivermectina (IVM) (0.2 mg / kg) a terneros parasitados (n = 8).

Tabla IV.2. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos (media \pm DE) de ricobendazole (RBZ) obtenidos tras su administración subcutánea (3.75 mg/kg), en forma única y combinada con ivermectina (IVM) (0.2 mg/kg) a terneros naturalmente parasitados.

RICOBENDAZOLE		
Parámetros Farmacocinéticos	RBZ	RBZ+IVM
T_{max} (h)	7.75 \pm 1.67	9.00 \pm 2.39
C_{max} (μ g/mL)	0.85 \pm 0.31	0.77 \pm 0.31
ABC_{0-LOQ} (μ g.h/mL)	10.8 \pm 3.44	10.9 \pm 4.70
ABC_{∞} (μ g.h/mL)	11.2 \pm 3.41	11.4 \pm 4.87
TMR (h)	10.1 \pm 1.05	10.5 \pm 1.01
T_{1/2el} (h)	4.15 \pm 0.90	4.47 \pm 1.14
T_{1/2abs} (h)	1.58 \pm 0.32	1.98 \pm 0.46

T_{max}: tiempo en que se obtiene la concentración plasmática máxima; **C_{max}**: concentración plasmática máxima; **ABC_{0-LOQ}**: área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 a tiempo de cuantificación; **ABC_{0- ∞}** : área bajo la curva de concentración vs tiempo extrapolado al infinito; **TMR**: tiempo medio de residencia; **T_{1/2el}**: vida media de eliminación; **T_{1/2abs}**: vida media de absorción.

Las concentraciones plasmáticas de ABZSO₂ luego de la administración SC de RBZ tanto en forma única como co-administrado con IVM se muestran en la Fig. IV.3. El metabolito sulfona alcanzó una C_{max} de 0.79 \pm 0.18 (RBZ Solo) y de 0.85 \pm 0.28 (RBZ+IVM) μ g/mL a las 12 y 11.5 hs post-tratamiento, respectivamente. El ABC_{0-LOQ} del ABZSO₂ fue similar en ambos tratamientos con valores de 9.70 \pm 1.73 y 10.2 \pm 3.11 μ g.h/mL para el grupo RBZ solo y el grupo RBZ+IVM, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas entre ambos tratamientos para los parámetros T_{max}, C_{max} y ABC (P>0.05). Por lo tanto, la presencia de IVM no afectó la disposición plasmática de ABZSO₂ luego de la administración SC de RBZ solo o en combinación.

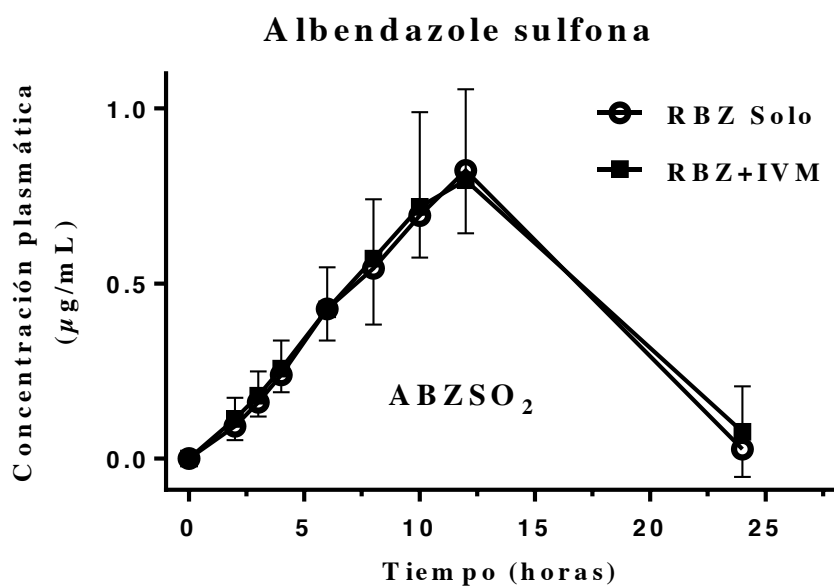


Figura IV.3. Perfiles de concentración plasmática (media \pm DE) de albendazole sulfona (ABZSO₂) obtenidos después de su administración subcutánea de RBZ en forma única (3.75 mg/kg) o combinada con ivermectina (IVM) (0.2 mg/kg) a terneros parasitados (n = 8).

En la Tabla IV.3 se pueden observar los resultados de la Reducción del Conteo de Huevos (RCH), con sus respectivos intervalos de confianza (95%), en los diferentes escenarios estudiados. Los resultados de la RCH indican que la combinación IVM+RBZ sólo alcanzó el 100% de eficacia clínica total en un escenario de susceptibilidad a ambos antihelmínticos. En un contexto de alta y media resistencia a IVM (48 y 67% RCH, respectivamente), se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el grupo IVM y el resto de los grupos tratados. En ambos escenarios, tanto RBZ sólo como la combinación mostraron una RCH por arriba del 90%, y aunque la combinación IVM+RBZ mostró la mayor eficacia clínica (98 y 99% en los escenarios de alta y media resistencia a IVM, respectivamente), las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre este grupo y el RBZ único ($P > 0.05$). En los escenarios de baja resistencia a uno de los dos antihelmínticos, los tres grupos evaluados (IVM sola, RBZ solo e IVM+RBZ) mostraron RCH similares ($P > 0.05$). A diferencia de los escenarios anteriores, en una situación de multi-resistencia, es decir con presencia de nematodos resistentes a IVM (54% de RCH) y a RBZ (84% de RCH), la combinación IVM+RBZ fue el único tratamiento que obtuvo una RCH mayor al 90%, logrando una

eficacia clínica total del 98%. En este escenario, se encontraron diferencias significativas en la RCH entre la combinación y el tratamiento único con RBZ ($P < 0.05$).

Tabla IV.3. Porcentajes de reducción de los conteos de huevos (RCH) (indiferenciados) con sus intervalos de confianza superior e inferior (95%) 14-15 días después de la administración subcutánea de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg) y ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) administrados por separado y co-administrados a terneros naturalmente parasitados.

Escenario Resistencia/ Susceptibilidad a IVM y RBZ	RCH ¹ Día 14-15 (IC)		
	IVM	RBZ	IVM + RBZ
Susceptibilidad IVM- Susceptibilidad RBZ	93% ^a (83-97)	98% ^a (94-99)	100% ^a
Alta resistencia IVM- Susceptibilidad RBZ	48% ^a (18-66)	94% ^b (89-97)	98% ^b (96-99)
Media resistencia IVM- Susceptibilidad RBZ	67% ^a (31-85)	98% ^b (95-99)	99% ^b (96-99)
Baja resistencia IVM- Susceptibilidad RBZ	82% ^a (70-89)	99% ^a (95-99)	99% ^a (94-99)
Susceptibilidad IVM Baja resistencia RBZ-	93% ^a (81-97)	87% ^a (75-94)	96% ^a (91-98)
Resistencia IVM- Resistencia RBZ	54% ^a (27-71)	84% ^b (73-91)	98% ^c (96-99)

¹RCH estimado según Coles *et al.*, (1992), Vet. Parasitol., 44:35-44.
RCH con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Las eficacias clínicas de los diferentes tratamientos contra los géneros *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. y *Oesophagostomum* spp. se muestran en la Tabla IV.4. Nuevamente, se incluyen los resultados de la RCH y los límites inferior y superior de los intervalos de confianza (95%). El escenario de susceptibilidad a ambos antihelmínticos en estudio fue en el único donde IVM y RBZ administrados en forma única o la combinación de ambos IVM+RBZ demostraron eficacias mayores al 90% contra todos los géneros parasitarios. En general, en los escenarios de resistencia *Cooperia* spp. fue el principal género implicado. Resultados destacables se observaron

en el escenario de alta resistencia a IVM, en el cual este antihelmíntico falló para controlar *Cooperia* spp. y *Haemonchus* spp., con eficacias de 83 y 0%, respectivamente; indicando resistencia a IVM en ambos géneros. En contraste, RBZ solo y la combinación IVM+RBZ obtuvieron altas eficacias contra *Cooperia* spp. y *Haemonchus* spp. (>90% RCH). Sin embargo, la combinación fue el único tratamiento que alcanzó un 100% de eficacia clínica contra *Haemonchus* spp. resistente a IVM. De hecho en este escenario, el tratamiento con la combinación IVM+RBZ tuvo una eficacia contra *Haemonchus* spp. significativamente mayor comparado al tratamiento único con RBZ ($P<0.05$). En forma similar, en el escenario de resistencia a IVM y a RBZ, ambos compuestos administrados en forma única fallaron en el control de *Cooperia* spp., alcanzando una eficacia clínica de 14% para IVM y 74% para RBZ, lo cual indica que en el presente establecimiento el género *Cooperia* spp. presentó resistencia tanto a IVM como a RBZ.

En este escenario, la combinación de ambos antihelmínticos fue el único tratamiento que logró una eficacia adecuada contra este género multi-resistente, alcanzando una RCH del 97% contra el mismo, el cual fue significativamente diferente a la RCH del RBZ solo ($p<0.05$). Por último, sólo se observó *Ostertagia* spp. resistente a RBZ, mientras que tanto la IVM sola como la combinación siempre mostraron alta eficacia contra este género. Todos los tratamientos lograron controlar efectivamente al género *Oesophagostomum* spp. en los diferentes escenarios evaluados.

Tabla IV.4. Porcentajes de reducción del conteo de huevos (RCH) con sus intervalos de confianza superior e inferior (95%) para *Cooperia*, *Haemonchus*, *Ostertagia* y *Oesophagostomum* spp. (basado en el recuento de huevos dividido en cada género según la proporción de los mismos en los coprocultivos antes y después de cada tratamiento) después de la administración subcutánea de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg) y ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) en forma única o co-administrados a terneros naturalmente parasitados.

Género parasitario - Tratamiento	RCH ¹ Día 15 (IC)					
	Susceptibilidad IVM- Susceptibilidad RBZ	Alta resistencia IVM- Susceptib. RBZ	Media resistencia IVM- Susceptib. RBZ	Baja resistencia IVM- Susceptib. RBZ	Susceptibilidad IVM-Baja resistencia RBZ	Resistencia IVM- Resistencia RBZ
<i>Cooperia</i> spp.						
Ivermectina	91% ^a	83% ^a	56% ^a	68% ^a	85% ^a	14% ^a
Ricobendazole	99% ^a	98% ^b	99% ^b	98% ^b	86% ^a	74% ^b
IVM+RBZ	100% ^a	98% ^b	99% ^b	98% ^b	92% ^a	97% ^c
<i>Haemonchus</i> spp.						
Ivermectina	100% ^a	0% ^a	100% ^a	99% ^a	100% ^a	95% ^a
Ricobendazole	95% ^a	97% ^b	96% ^a	87% ^a	99% ^a	100% ^b
IVM+RBZ	100% ^a	100% ^c	100% ^a	100% ^b	100% ^a	100% ^b
<i>Ostertagia</i> spp.						
Ivermectina	100% ^a	100%	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a
Ricobendazole	100% ^a	0%*	100% ^a	100% ^a	14% ^b	75% ^b
IVM+RBZ	100% ^a	72%*	100% ^a	100% ^a	99% ^a	99% ^a
<i>Oesophagost.</i> spp.						
Ivermectina	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a
Ricobendazole	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a
IVM+RBZ	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a

¹RCH estimado según Coles *et al.*, (1992), Vet. Parasitol., 44:35-44. RCH con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

*Los bajos recuentos de huevos asociados con *Ostertagia* spp. podrían determinar que la eficacia contra este género resulte poco fiable.

La excreción de los huevos a la pastura (reportada como la suma de los 15 animales incluidos en cada grupo experimental) se puede observar en la Tabla IV.5. A pesar que no se observan diferencias significativas en términos de la eficacia clínica, se encontró que la excreción de huevos a la pastura fue mucho más baja luego del tratamiento combinado. Dentro de los grupos tratados, el grupo IVM sola mostró la suma más alta de huevos excretados (9.586.374), seguido por el RBZ solo (922.325) y el grupo combinado (250.246).

Tabla IV.5. Patrón de excreción de los huevos a la pastura luego de la administración de IVM y RBZ en forma separada o combinada a terneros parasitados con nematodos resistentes a IVM. Se estimó el número total de excreción de huevos de nematodos por día basado en el peso de cada ternero, cantidad de heces excretadas por día y el conteo de huevos por gramo (HPG). Se muestran los promedios de cuatro establecimientos ganaderos comerciales con resistencia a IVM.

Grupo Experimental (n=15)	Peso vivo promedio (kg)	Promedio cantidad de heces excretadas por animal/día (g) ¹	Cantidad total heces excretadas por grupo/día (kg)	Día 15			
				EPG (promedio)	RCH (%)	Número total huevos excretados por día ²	% de huevos eliminados respecto al grupo CONTROL
CONTROL	211 ^a	3449 ^a	48.4 ^a	689 ^a		32 023 821 ^a	100%
IVM	210 ^a	3432 ^a	45.8 ^a	222 ^a	68	9 586 374 ^a	29.9%
RBZ	212 ^a	3480 ^a	48.9 ^a	22 ^b	97	922 325 ^b	2.9%
IVM+RBZ	212 ^a	3478 ^a	48.9 ^a	6 ^b	99	250 246 ^b	0.8%

¹Heces excretadas por animal/día estimadas según Stromberg (1997).

²Suma de huevos excretados por día por los 15 animales incluidos en cada grupo experimental. Los valores con diferentes letras son estadísticamente diferentes (P <0.05).

IV.2 Caracterización de potenciales interacciones farmacocinéticas- farmacodinámicas para la combinación ricobendazole-levamisole en un escenario susceptible

IV.2.1 Objetivos

Evaluar las posibles interacciones farmacocinéticas y la eficacia clínica luego de la administración subcutánea conjunta de RBZ y LEV en terneros naturalmente parasitados con nematodos GI susceptibles a ambas fármacos. La eficacia clínica se realizó en dos estaciones, invierno y primavera, con predominio de diferentes poblaciones de nematodos.

IV.2.2 Diseño y metodología

Establecimiento ganadero

El presente ensayo se realizó en un establecimiento ganadero comercial, el cual contaba con un sistema de invernada de bovinos con base pastoril. La selección del establecimiento se basó en reportes previos de susceptibilidad a IVM y RBZ. El estudio parasitológico se llevó a cabo en dos etapas, invierno y primavera, en el mismo establecimiento comercial. Los animales se mantuvieron bajo condiciones naturales de campo durante todo el período del ensayo.

Animales experimentales

En ambas estaciones del año, se incluyeron en el ensayo 60 terneros (8-10 meses de edad) naturalmente infectados con nematodos GI susceptibles a IVM y a RBZ. Los animales fueron seleccionados en base al HPG y fueron caravaneados y pesados al inicio. En invierno, sólo los animales con al menos 300 HPG en el día -1 fueron incluidos en el ensayo, mientras que en la primavera el límite inferior fue de 100 HPG.

El rodeo del cual se seleccionaron los animales se trató con LEV al ingreso y estuvo pastoreando en el establecimiento por dos meses previos al inicio del ensayo. De esta forma, se aseguró que la carga parasitaria fuera nativa del campo donde se realizó el estudio. Durante la duración de cada experimento, los animales permanecieron en la misma pastura, y tuvieron agua ad-líbitum.

Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Animales experimentales” (capítulo II.1.1).

Diseño experimental y tratamientos

Todos los animales parasitados (n=60) fueron ordenados según el conteo de HPG, y luego divididos en cuatro grupos experimentales (n=15). El HPG promedio al día -1 fue similar en todos los grupos. Los animales experimentales recibieron uno de los siguientes tratamientos por vía SC en el día 0: RBZ (Bayverm PI[®], 15% solution, Bayer) administrado a 3.75 mg/kg; LEV (Ripercol L Fosfato[®], 18.8% solution, Zoetis) administrado a 8 mg/kg; o ambos RBZ (Bayverm PI[®]) y LEV (Ripercol L Fosfato[®]) administrados a 3.75 y 8 mg/kg, respectivamente. Para el estudio de eficacia clínica, se mantuvo un grupo no tratado como control. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Animales experimentales” (capítulo II.1.1).

Estudio Farmacocinético

El estudio farmacocinético se realizó en invierno. Ocho animales de cada grupo tratado (RBZ, LEV y RBZ+LEV) fueron seleccionados al azar para la obtención de muestras de sangre previo al tratamiento (tiempo ~~hora~~ 0) y a los siguientes tiempos post-tratamiento: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 24 hs. Las muestras de sangre fueron obtenidas utilizando tubos Vacutainers heparinizados de 10 mL (Becton Dickinson, NJ, USA). El plasma fue separado por centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos, luego colocado en tubos plásticos y almacenados a -20 ° C hasta el momento de su análisis por HPLC. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Cuantificación de analitos” (II.2.1).

Estudio Parasitológico

La eficacia clínica de los tratamientos fue determinada por el TRCH, para lo cual se obtuvieron muestras individuales de materia fecal de todos los animales a los 15 días post-tratamiento. Adicionalmente, se realizaron cultivos de materia fecal individuales y de un “pool” obtenido de cada grupo experimental, a fin de evaluar los géneros parasitarios presentes a través de la identificación de larvas (L3). Los procedimientos siguieron lo descrito en las secciones “Estudio parasitológico” (capítulo II.2.2) y “Análisis Parasitológico” (Capítulo II.3.2).

Análisis farmacocinético, parasitológico y estadístico de los datos

El análisis de datos siguió las pautas establecidas en el capítulo “Análisis de datos” (Capítulo II.3). Los parámetros farmacocinéticos y parasitológicos para los animales de los respectivos grupos experimentales, fueron promediados y expresados como media aritmética (\bar{X}) \pm desvío estándar (DE). Los parámetros farmacocinéticos se compararon estadísticamente usando la prueba t de Student. Los recuentos de HPG se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el software InStat 3.0 (Graph Pad Software, CA, EE. UU.).

IV.2.3 Resultados

La Fig. IV.4 presenta los perfiles de concentración plasmática (media \pm DE) de RBZ y LEV luego de su administración SC en terneros. Se observó una persistencia similar en plasma para ambas moléculas, las cuales fueron detectadas hasta las 24 hs post-tratamiento. Las ABC_{0-LOQ} tanto para RBZ como para LEV representaron un porcentaje $\geq 95\%$ del $ABC_{0-\infty}$ para cada molécula, demostrando que el tiempo de muestreo fue el adecuado. Ambos antihelmínticos fueron bien tolerados, ya que no se observaron eventos adversos en los animales tratados.

Perfiles de concentración plasmática de Ricobendazole y Levamisole

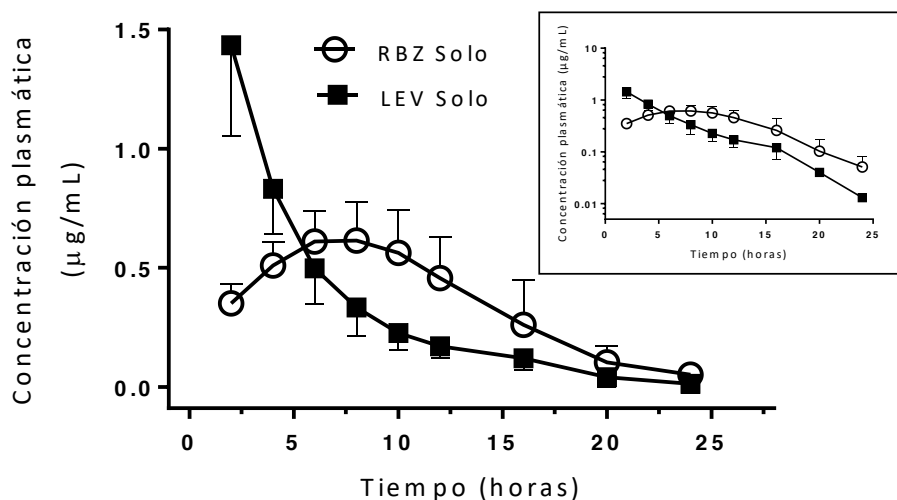


Figura IV.4. Perfiles de concentración plasmática (media \pm DE) de ricobendazol (RBZ) y levamisole (LEV) obtenidos después de su administración subcutánea (3.75 mg/kg y 8 mg/kg, respectivamente) a terneros (n = 8). En el inserto se grafican en forma semilogarítmica los perfiles de concentración plasmática (media \pm DE) de IVM y RBZ.

Los perfiles de concentración plasmática (media \pm SD) de RBZ luego de su administración SC en forma única y co-administrado con LEV se muestran en la Fig. IV.5. Además, la Tabla IV.6 resume los parámetros farmacocinéticos para RBZ obtenidos luego de ambos tratamientos. La presencia de LEV no afectó la disposición plasmática de RBZ después de su administración SC. El valor del ABC_{0-LOQ} obtenido luego de administrar el RBZ en forma única ($8.20 \pm 2.53 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) fue similar al obtenido luego del tratamiento combinado ($10.1 \pm 4.01 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). De hecho, no se observaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en los parámetros farmacocinéticos entre ambos tratamientos.

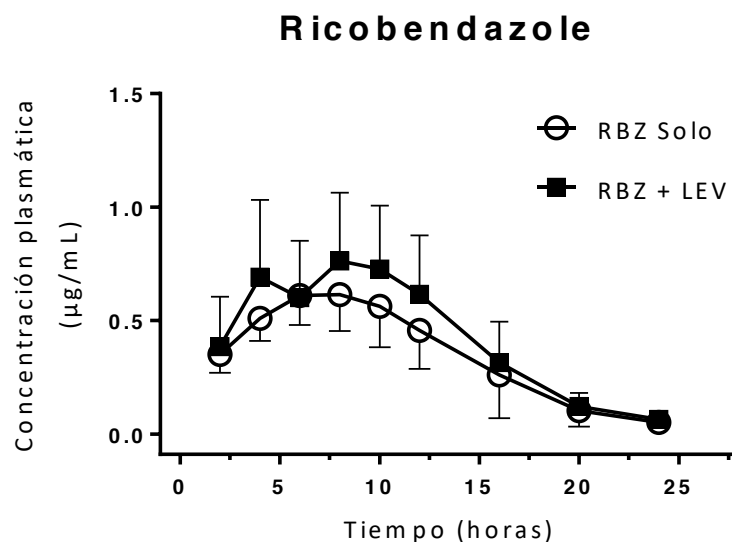


Figura IV.5. Perfiles de concentración plasmática (media \pm DE) de ricobendazole (RBZ) obtenidos después de su administración subcutánea en forma única (3.75 mg/kg) o combinada con levamisole (LEV) (8 mg/kg) a terneros parasitados (n = 8).

La Fig. IV.6 presenta los perfiles de concentración plasmática (media \pm SD) de LEV luego de su administración SC en forma única y combinada con RBZ. Ambos tratamientos muestran perfiles plasmáticos similares. La Tabla IV.6 resume los parámetros farmacocinéticos para LEV obtenidos luego su administración en forma única o co-administrado con RBZ. La presencia de RBZ no afectó la disposición plasmática de LEV. No se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los parámetros luego de su administración en forma única y combinada

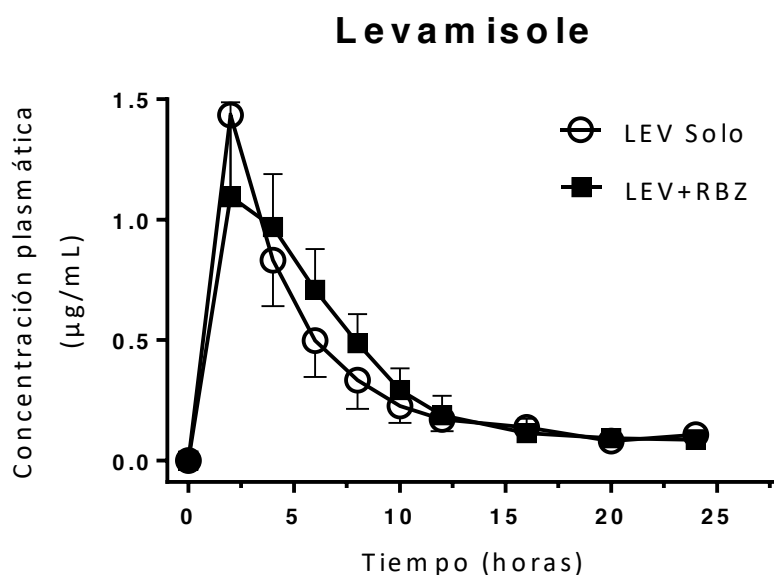


Figura IV.6. Perfiles de concentración plasmática (media \pm DE) de levamisole (LEV) obtenidos después de su administración subcutánea en forma única (8 mg/kg) o combinada con ricobendazole (RBZ) (3.75 mg/kg) a terneros parasitados (n = 8).

Tabla IV.6. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos (media \pm DE) de ricobendazole (RBZ) y levamisole (LEV) obtenidos tras su administración subcutánea (3.75 mg/kg y 8 mg/kg, respectivamente), en forma única y co-administrados a terneros naturalmente parasitados

Parámetros Farmacocinéticos	RICOBENDAZOLE		LEVAMISOLE	
	RBZ	RBZ+LEV	LEV	LEV+RBZ
T_{max} (h)	7.43 \pm 1.51	7.50 \pm 1.41	2.00 \pm 0.00	2.00 \pm 0.00
C_{max} (μ g/mL)	0.64 \pm 0.15	0.84 \pm 0.32	1.43 \pm 0.38	1.51 \pm 0.55
ABC_{0-LOQ} (μ g.h/mL)	8.20 \pm 2.53	10.1 \pm 4.01	7.66 \pm 2.12	9.07 \pm 2.45
$ABC_{0-\infty}$ (μ g.h/mL)	8.48 \pm 2.61	10.4 \pm 3.97	8.00 \pm 2.26	9.30 \pm 2.64
TMR (h)	9.88 \pm 0.91	10.5 \pm 1.64	6.10 \pm 1.49	6.50 \pm 1.78
$T_{1/2abs}$ (h)	1.79 \pm 0.93	1.40 \pm 0.50	1.07 \pm 0.51	1.87 \pm 1.44
$T_{1/2el}$ (h)	3.81 \pm 0.96	3.90 \pm 1.20	6.74 \pm 1.68	5.37 \pm 2.05

T_{max} : tiempo en que se obtiene la concentración plasmática máxima; C_{max} : concentración plasmática máxima; ABC_{0-LOQ} : área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 a tiempo de cuantificación; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva de concentración vs tiempo extrapolado al infinito; TMR : tiempo medio de residencia; $T_{1/2el}$: vida media de eliminación; $T_{1/2abs}$: vida media de absorción.

La Fig. IV.7 presenta las diferencias con respecto a la población de nematodos GI entre el invierno y la primavera en animales no tratados. La variación más importante fue en términos del porcentaje de *Ostertagia* spp.: mientras que en el invierno sólo se reportó un 10% de *Ostertagia* spp., este género aumentó hasta 28% del total de la población de nematodos GI presentes en la primavera. El promedio de los conteos de HPG en cada grupo control demostraron un nivel alto de infección el día 0, pudiéndose observar diferencias en los conteos entre ambas estaciones. Mientras que en el invierno el HPG promedio de los animales control al día 0 fue de 871 (320-1700), en la primavera decreció a 316 (120-460).

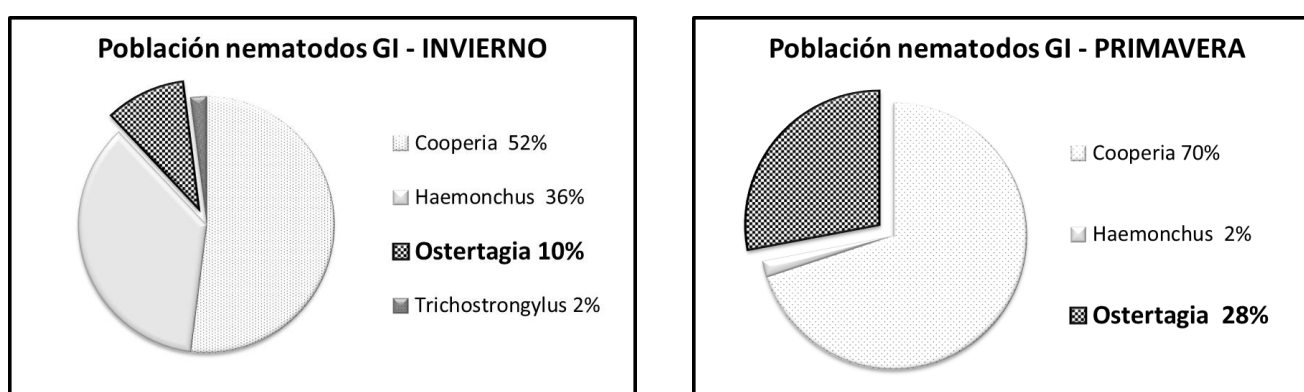


Figura IV.7. Población relativa de nematodos gastrointestinales, basada en la composición de L3, observada después de los coprocultivos de muestras de terneros control (no tratados) en invierno y primavera.

En la Tabla IV.7 se pueden observar los resultados de la RCH total para cada tratamiento en invierno y primavera, con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. En invierno, la RCH a los 15 días para todos los tratamientos estuvo por arriba del 90%, demostrando que la población de nematodos GI de este establecimiento era susceptible a RBZ y a LEV, pero la combinación fue el único tratamiento que alcanzó una eficacia clínica del 100%. Sin embargo, en primavera, la RCH para todos los tratamientos fue elevada, sin embargo la eficacia del tratamiento combinado fue del 96%. No se observaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre la administración única y combinada ni en invierno ni en primavera.

Tabla IV.7. Porcentajes de reducción de los conteos de huevos (RCH) (indiferenciados) con sus intervalos de confianza superior e inferior (95%) 15 días después de la administración subcutánea de ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) y levamisole (LEV, 8 mg/kg) administrados por separado y co-administrados a terneros naturalmente parasitados.

Estación del año	RCH ¹ Día 15 (IC)		
	RBZ	LEV	RBZ+LEV
Invierno	96% (83-99)	99% (98-99)	100%
Primavera	95% (86-98)	93% (80-97)	96% (87-99)

¹RCH estimado según Coles *et al.*, (1992), Vet. Parasitol., 44:35-44. RCH para todos los tratamientos, P>0.05.

Las eficacias clínicas de los diferentes tratamientos contra los géneros *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. y *Trichostrongylus* spp. se muestran en la Tabla IV.8. Aunque todos los tratamientos lograron controlar efectivamente a todos los géneros de nematodos GI presentes, existieron algunas diferencias importantes entre las estrategias de administración única y combinada. En invierno, mientras algunos ejemplares de *Haemonchus* spp. sobrevivieron al tratamiento con RBZ solo (90% RCH), algunos ejemplares de *Ostertagia* spp. sobrevivieron al tratamiento con LEV solo (98% RCH). En contraste, la combinación RBZ+LEV fue el único tratamiento que logró una eficacia clínica del 100% contra *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. y *Trichostrongylus* spp. durante el invierno. Sin embargo, en primavera, la combinación no logró controlar efectivamente *Ostertagia* spp., mostrando una eficacia clínica del 89% contra este género. Sin embargo, contemplando que el conteo de huevos para *Ostertagia* spp. fue bajo, los presentes resultados deben ser interpretados con cautela (el valor de eficacia contra *Ostertagia* spp. no significa necesariamente presencia de resistencia antihelmíntica).

Tabla IV.8. Porcentajes de reducción del conteo de huevos (RCH) con sus intervalos de confianza superior e inferior (95%) para *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. y *Trichostrongylus* spp. (basado en el recuento de huevos dividido en cada género según la proporción de los mismos en los coprocultivos antes y después de cada tratamiento) después de la administración subcutánea de ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) y levamisole (LEV, 8 mg/kg) en forma única o co-administrados a terneros naturalmente parasitados en invierno y en primavera.

Género parasitario - Tratamiento	RCH ¹ Día 15 (IC)	
	Invierno	Primavera
<i>Cooperia</i> spp.		
Ricobendazole	100%	97%
Levamisole	100%	100%
RBZ+LEV	100%	100%
<i>Haemonchus</i> spp.		
Ricobendazole	90%	80%*
Levamisole	100%	100%
RBZ+LEV	100%	100%
<i>Ostertagia</i> spp.		
Ricobendazole	100%	94%
Levamisole	98%	80%*
RBZ+LEV	100%	89%*
<i>Trichostrong.</i> spp.		
Ricobendazole	100%	-
Levamisole	100%	-
RBZ+LEV	100%	-

¹RCH estimado según Coles *et al.*, (1992), Vet. Parasitol., 44:35-44. RCH para todos los géneros, P>0.05.

*Los bajos recuentos de huevos asociados con *Ostertagia* spp. y *Haemonchus* spp. determinan que la eficacia contra estos géneros no represente resistencia antihelmíntica.

IV.3 Efecto de la vía de administración en la eficacia de ivermectina sobre nematodos susceptibles y resistentes

IV.3.1 Objetivos

Evaluar el comportamiento farmacocinético y la eficacia clínica contra nematodos GI susceptibles y resistentes después de la administración oral y subcutánea de IVM en bovinos.

IV.3.2 Diseño y metodología

Establecimientos ganaderos con susceptibilidad/resistencia antihelmíntica a IVM

Se realizaron experimentos en seis (6) establecimientos ganaderos comerciales con predominio de una población de nematodos GI susceptibles o resistentes a IVM. De esta forma se trabajó con dos (2) establecimientos susceptibles (Susceptible A y B), y cuatro (4) establecimientos resistentes (Resistente 1, 2, 3 y 4). La selección de los establecimientos comerciales se basó en reportes previos de susceptibilidad/resistencia a IVM. Todos los establecimientos ganaderos donde se realizaron los ensayos poseían un sistema de invernada de bovinos con base pastoril.

Animales experimentales

En cada establecimiento, se incluyeron en el ensayo 45 terneros (8-10 meses de edad) naturalmente infectados con nematodos GI susceptibles o resistentes a IVM. Los animales fueron seleccionados en base al HPG y fueron caravaneados y pesados al inicio del experimento.

El rodeo del cual se seleccionaron los animales se trató con LEV al ingreso y estuvo pastoreando en el establecimiento por dos meses previos al inicio del ensayo. De esta forma, se aseguró que la carga parasitaria fuera nativa del campo donde se realizó el estudio. Durante la duración de cada experimento, los animales permanecieron en la misma pastura, y tuvieron agua ad-líbitum. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Animales experimentales” (Capítulo II.1.1).

Diseño experimental y tratamientos

En cada establecimiento, todos los animales parasitados (n=45) fueron ordenados según el conteo de HPG, y luego divididos en tres grupos experimentales (n=15): Grupo control: los animales no recibieron tratamiento antihelmíntico; Grupo IVMsc: los animales fueron tratados por vía SC con IVM (Ivomec[®], 1% solución, Merial) a la dosis de 0.2 mg/kg y Grupo IVMoral: los animales fueron tratados por vía ORAL con IVM (Ivomec[®], 1% solución, Merial) a la dosis de 0.2 mg/kg. En el tratamiento oral se utilizó la misma formulación comercial utilizada para el tratamiento SC, ya que no existe en Argentina una formulación comercial de IVM indicada para la administración oral específicamente. El HPG promedio al día -1 fue similar en todos los grupos. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Animales experimentales” (Capítulo II.1.1).

Estudio Farmacocinético

El estudio farmacocinético se realizó en el establecimiento Susceptible A. Ocho animales de cada grupo tratado (IVMsc e IVMoral) fueron seleccionados al azar para la obtención de muestras de sangre previo al tratamiento (tiempo 0) y a los siguientes tiempos post-tratamiento: 3, 6, 9, 12 y 24 hs; y 2, 3, 4, 7, 9, 12 y 25 días. Además se tomaron muestras de materia fecal a los días 1, 2, 3, 4, 7, 9, 12 y 25 post-tratamiento. Las muestras de sangre fueron obtenidas utilizando tubos Vacutainers heparinizados de 10 mL (Becton Dickinson, NJ, USA). El plasma fue separado por centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos y luego colocado en tubos plásticos. Mientras que las muestras de materia fecal se obtuvieron directamente del recto de cada animal en tubos plásticos. Ambas muestras fueron almacenadas a -20 ° C hasta el momento de su análisis por HPLC. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Cuantificación de analitos” (II.2.1).

Estudio Parasitológico

La eficacia clínica de los tratamientos fue determinada por el TRCH, para lo cual se obtuvieron muestras individuales de materia fecal de todos los animales a los 15 días post-tratamiento. Adicionalmente, se realizaron cultivos de materia fecal individuales y de un “pool” obtenido de cada grupo experimental, a fin de evaluar los géneros parasitarios presentes a través de la identificación de larvas (L3). Los procedimientos siguieron lo descrito en las secciones “Estudio

parasitológico” (Capítulo II.2.2) y “Análisis Parasitológico” (Capítulo II.3.2). En el presente experimento, y sólo a fines comparativos, también se calculó la eficacia clínica con la fórmula que no contempla el grupo control: $RCH (\%) = 100 (1 - [T2/T1])$, donde, T2 corresponde al promedio de HPG post-tratamiento el día 15 y T1 al promedio de HPG pre-tratamiento el día 0 (McKenna, 1990a).

Análisis farmacocinético, parasitológico y estadístico de los datos

El análisis de datos siguió las pautas establecidas en el capítulo “Análisis de datos” (capítulo II.3). Los parámetros farmacocinéticos y parasitológicos para los animales de los respectivos grupos experimentales, fueron promediados y expresados como media aritmética (X) \pm desvío estándar (DE). Los parámetros farmacocinéticos se compararon estadísticamente usando la prueba t de Student. Los recuentos de HPG se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el software Instat 3.0 (Graph Pad Software, CA, EE. UU.).

IV.3.3 Resultados

La Fig. IV.8 presenta los perfiles de concentración plasmática (media \pm DE) de IVM luego de su administración por la vía SC u oral en terneros. Se puede observar una concentración plasmática de IVM mayor después del tratamiento SC, lo cual representa una mayor disponibilidad sistémica luego de este tratamiento en comparación a la vía oral. De hecho, la disponibilidad sistémica de IVM (estimada como ABC_{0-LOQ}) obtenida después de la administración SC (421.0 ± 70.3 ng.d/mL) fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a la observada luego del tratamiento oral (121.5 ± 32.2 ng.d/mL). Los parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración de IVM por ambas vías se resumen en la Tabla IV.9.

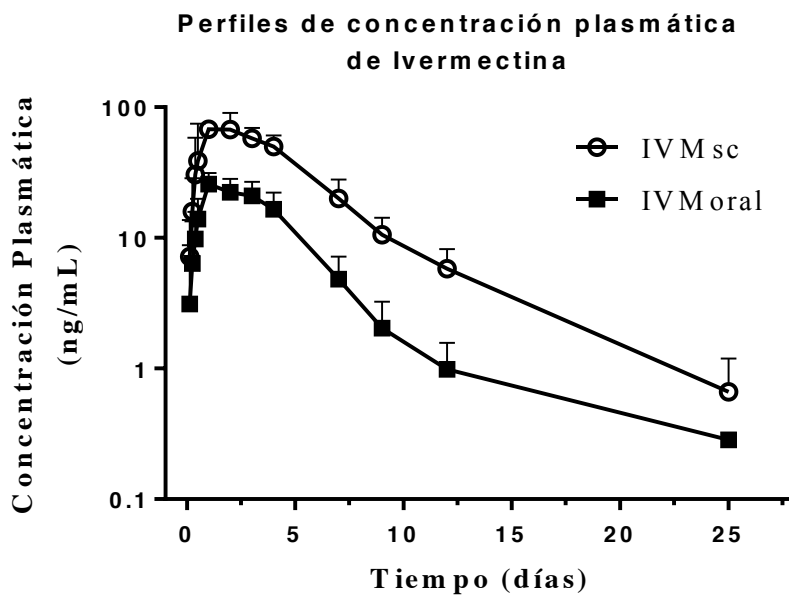


Figura IV.8. Perfiles de concentración plasmática de ivermectina (IVM) (media \pm DE) obtenidos después de su administración subcutánea (IVMsc) y oral (IVMoral) (0.2 mg /kg) a terneros (n = 8).

Tabla IV.9. Parámetros farmacocinéticos en plasma y en materia fecal (media \pm DE) de ivermectina (IVM) obtenidos tras su administración subcutánea (SC) y oral (0.2 mg/kg) a terneros.

Parámetros Farmacocinéticos	IVERMECTINA			
	PLASMA		MATERIA FECAL	
	IVM	IVM	IVM	IVM
	SC	ORAL	SC	ORAL
T_{max} (d)	2.12 \pm 1.13 ^a	1.62 \pm 0.92 ^a	2.13 \pm 0.64 ^a	1.38 \pm 0.52 ^b
C_{max} (ng/mL)	76.8 \pm 40.0 ^a	28.7 \pm 4.73 ^b	618 \pm 270 ^a	4866 \pm 689 ^b
ABC_{0-LOQ} (ng.d/mL)	421 \pm 70.2 ^a	121 \pm 32.1 ^b	4760 \pm 924 ^a	9896 \pm 1931 ^b
$ABC_{parcial}$ (0-4) (ng.d/mL)	-	-	1527 \pm 507 ^a	9170 \pm 1985 ^b

T_{max} : tiempo en que se obtiene la concentración plasmática máxima; C_{max} : concentración plasmática máxima; ABC_{0-LOQ} : área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 a tiempo de cuantificación; $ABC_{parcial}$ (0-4): área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 a 4 días post-tratamiento.

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en los parámetros obtenidos entre las diferentes vías de administración ($P < 0.05$).

En contraste a lo observado en plasma, se obtuvieron concentraciones fecales de IVM mayores luego del tratamiento oral (Fig. IV.9). Las mayores diferencias en las concentraciones entre ambas vías de administración fueron detectadas hasta los cuatro días post-tratamiento (gráfico añadido en Fig. IV.9). De hecho, el $ABC_{parcial}$ (0-4) fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en heces obtenida de terneros tratados por vía oral (9170 \pm 1985 ng.d/g) comparada con la obtenida de los tratados por vía SC (1527 \pm 507 ng.d/g).

Perfiles de concentración fecal de Ivermectina

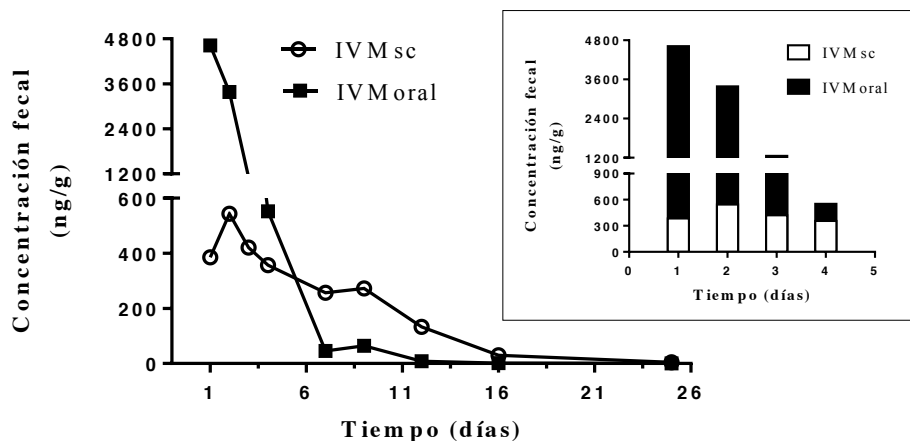


Figura IV.9. Perfiles de concentración en materia fecal de ivermectina (IVM) (media \pm DE) obtenidos después de su administración subcutánea y oral (0.2 mg /kg) a terneros (n = 8). El gráfico añadido muestra las concentraciones fecales de IVM hasta los 4 días post-tratamiento.

En la Tabla IV.10 se pueden observar los resultados de la RCH total para cada experimento, con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. En los dos establecimientos susceptibles (A y B), las RCH a los 15 días tanto para la vía de administración SC como la oral estuvieron por arriba del 90%, demostrando que la población de nematodos GI de estos establecimientos eran susceptibles a IVM. En cambio, en todos los establecimientos resistentes (1,2, 3, 4) las eficacias clínicas totales para ambas vías estuvieron por debajo del 90%. Sin embargo, se pueden observar algunas diferencias entre los distintos establecimientos, ya que los campos resistentes 1 y 2 muestran una mayor eficacia para la administración oral. Mientras que en los establecimientos resistentes 3 y 4 las eficacias para ambas vías de administración fueron similares. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre la administración SC y oral ni en los escenarios susceptibles ni en los resistentes.

Tabla IV.10. Porcentajes de reducción de los conteos de huevos (RCH) (indiferenciados) con sus intervalos de confianza superior e inferior (95%) 15 días después de la administración subcutánea y oral de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg) a terneros naturalmente parasitados.

Establecimiento	RCH ¹ Día 15 (IC)		RCH ² Día 15 (IC)	
	IVMsc	IVMoral	IVMsc	IVMoral
SUSCEPTIBLE A	93% (81-97)	91% (74-97)	96% (89-98)	94% (84-98)
SUSCEPTIBLE B	93% (81-97)	92% (78-97)	94% (83-98)	94% (87-98)
RESISTENTE 1	36% (0-71)	63% (25-81)	54% (16-74)	74% (59-83)
RESISTENTE 2	68% (31-85)	81% (62-90)	68% (42-83)	84% (72-91)
RESISTENTE 3	0% (0-46)	0,3% (0-42)	20% (0-60)	19% (0-54)
RESISTENTE 4	40% (0-73)	41% (2-65)	47% (0-74)	35% (0-67)

¹RCH estimado según Coles *et al.*, (1992), Vet. Parasitol., 44:35-44.

²RCH estimado según fórmula sin incluir el grupo control (McKenna, 1990a). Los valores obtenidos con esta fórmula sólo se muestran con fines comparativos pero no se incluyen en el análisis, dado que fueron similares a los calculados según Coles *et al.*, (1992).

RCH para todos los tratamientos, P>0.05.

Las eficacias clínicas de los diferentes tratamientos contra los géneros *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Oesophagostomum* spp. y *Trichostrongylus* spp. se muestran en la Tabla IV.11. Se puede observar que a pesar de haber demostrado eficacias totales adecuadas (por arriba del 90%), en los establecimientos susceptibles existe *Cooperia* spp. resistente a IVM, ya que en ambos campos (A y B) tanto la vía SC como la oral presentaron RCH por debajo del 90%. Con respecto a los escenarios de resistencia, en los establecimientos donde la eficacia clínica total fue mayor para la administración oral de IVM (resistencia 1 y 2), el único género resistente a este antihelmíntico fue *Cooperia* spp., ya que ambas vías presentaron eficacias clínicas menores al 90% contra este género parasitario. En el caso de los campos donde ambas vías de administración obtuvieron eficacias similares (resistencia 3 y 4), se encontraron tanto *Cooperia* spp. como *Haemonchus* spp. resistentes a IVM (vía SC y oral con RCH por debajo del 50% para ambos géneros parasitarios). Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre

ambas vías en la RCH contra el género *Haemonchus* spp. en el establecimiento resistente 4. IVM administrada por ambas vías logró controlar efectivamente a los género *Ostertagia* spp., *Oesophagostomum* spp. y *Trichostrongylus* spp. en todos los escenarios evaluados.

Tabla IV.11. Porcentajes de reducción del conteo de huevos (RCH) con sus intervalos de confianza superior e inferior (95%) para *Cooperia*, *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Oesophagostomum* y *Trichostrongylus* spp. (basado en el recuento de huevos dividido en cada género según la proporción de los mismos en los coprocultivos antes y después de cada tratamiento) después de la administración subcutánea y oral de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg) a terneros naturalmente parasitados.

Género parasitario - Tratamiento	RCH ¹ Día 15 (IC)					
	SUSCEPTIBLE A	SUSCEPTIBLE B	RESISTENTE 1	RESISTENTE 2	RESISTENTE 3	RESISTENTE 4
<i>Cooperia</i> spp.						
IVMsc	78% ^a	85% ^a	0% ^a	56% ^a	0% ^a	47% ^a
IVMoral	74% ^a	83% ^a	36% ^a	74% ^a	0% ^a	23% ^a
<i>Haemonchus</i> spp.						
IVMsc	100% ^a	100% ^a	94% ^a	100% ^a	0% ^a	0% ^a
IVMoral	100% ^a	100% ^a	97% ^a	100% ^a	5% ^a	76% ^b
<i>Ostertagia</i> spp.						
IVMsc	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	97% ^a
IVMoral	100% ^a	91% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	91% ^a
<i>Oesophagost.</i> spp.						
IVMsc	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	-
IVMoral	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	100% ^a	-
<i>Trichostrong.</i> spp.						
IVMsc	-	-	100% ^a	-	-	-
IVMoral	-	-	100% ^a	-	-	-

¹RCH estimado según Coles *et al.*, (1992), Vet. Parasitol., 44:35-44.

RCH con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

IV.4 Impacto productivo de la resistencia antihelmíntica en bovinos

IV.4.1 Objetivos

Evaluar, en un sistema real de producción bovina, el impacto de la resistencia antihelmíntica sobre la productividad de bovinos naturalmente parasitados con nematodos GI resistentes a ivermectina y moxidectin.

IV.4.2 Diseño y metodología

Establecimiento ganadero

El presente ensayo se realizó en un establecimiento ganadero comercial, el cual contaba con un sistema de invernada de bovinos con base pastoril. La selección del establecimiento se basó en reportes previos de resistencia a IVM y a MXD.

Animales experimentales

A partir de un mismo lote de terneros machos naturalmente infectados con nematodos GI resistentes a IVM y MXD, se armaron dos rodeos (A y B) de 90 terneros cada uno (8-10 meses de edad), los cuales empezaron a pastorear diferentes recursos forrajeros: Rodeo A en rotación verdeo Ray-Grass-maíz diferido (baja re-infección parasitaria), y Rodeo B en pastura de *Agropyrum* de dos años (alta re-infección parasitaria). Los animales fueron seleccionados en base al peso y al HPG, y fueron caravaneados al inicio. El promedio de peso al inicio del Rodeo A fue de 204 ± 8 kg, mientras que para el Rodeo B fue de 231.8 ± 13 kg. Sólo los animales con al menos 250 HPG en el día -1 fueron incluidos en el ensayo. El HPG promedio al inicio del ensayo fue de 1050 ± 145 con un rango de 887 a 1317 en el Rodeo A, y de 931 ± 29 con un rango de 883 a 955 en el Rodeo B. Todos los animales incluidos en el ensayo fueron de raza británica.

El rodeo del cual se seleccionaron los animales se trató con LEV al ingreso y estuvo pastoreando en el establecimiento por dos meses previos al inicio del ensayo. De esta forma, se aseguró que la carga parasitaria fuera nativa del campo donde se realizó el estudio. Durante el experimento, los animales permanecieron en el mismo recurso forrajero, y tuvieron agua ad-libitum. Los

detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Animales experimentales” (Capítulo II.1.1).

Diseño experimental y tratamientos

En cada rodeo, todos los animales parasitados (n=90) fueron ordenados según el peso y el conteo de HPG, y luego divididos en cinco grupos experimentales (n=18). El peso y el HPG promedio al día -1 fueron similar en todos los grupos. Los animales experimentales recibieron uno de los siguientes tratamientos por vía SC en el día 0: IVM (Ivomec[®], 1% solución, Merial) administrado a la dosis de 0.2 mg/kg; MXD (Cydectin Alfa[®], 1% solución, Zoetis) administrado a la dosis de 0.2 mg/kg; RBZ (Axilur[®] PI Inyectable, 15% solución, MSD Animal Health) administrado a 3.75 mg/kg; o la combinación IVM+RBZ (Ivomec[®] y Axilur[®]) administrados a 0.2 mg/kg y a 3.75 mg/kg, respectivamente. Además, en cada rodeo se mantuvo un grupo no tratado como control. Los detalles metodológicos siguieron lo descrito en la sección “Animales experimentales” (Capítulo II.1.1).

Estudio Parasitológico

La eficacia clínica de los tratamientos fue determinada por el TRCH, para lo cual se obtuvieron muestras individuales de materia fecal de todos los animales a los 19 días post-tratamiento. En este caso, se tomaron las muestras de materia fecal a los 19 días post-tratamiento, dado que por razones de clima fue imposible encerrar los animales a los 15 días post-tratamiento. Adicionalmente, se realizaron cultivos de materia fecal individuales y de un “pool” obtenido de cada grupo experimental, a fin de evaluar los géneros parasitarios presentes a través de la identificación de larvas (L3). Los procedimientos siguieron lo descrito en las secciones “Estudio parasitológico” (Capítulo II.2.2) y “Análisis Parasitológico” (Capítulo II.3.2).

Estudio Impacto productivo

Para cuantificar el impacto productivo de la resistencia antihelmíntica, se registraron los pesos individuales a los 0, 20, 34, 67 y 91 días post-tratamiento. De esta forma, se determinó la ganancia

de peso vivo (GPV) (kg) durante los 91 días de duración del ensayo de todos los grupos experimentales. Además, se estimó el impacto económico transformado los kg dejados en ganar al tratar con antihelmínticos ineficaces en dólares americanos (US\$). El mencionado análisis económico se realizó en base a los precios de venta de la categoría ternero en el Mercado de Liniers (Mercado de Liniers, diciembre 2017).

Análisis estadístico de los datos

El análisis de datos siguió las pautas establecidas en el capítulo “Análisis de datos” (Capítulo II.3). Los parámetros parasitológicos y de peso corporal para los animales de los respectivos grupos experimentales, fueron promediados y expresados como media aritmética (X) \pm desvío estándar (DE). Los recuentos de HPG se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para el análisis estadístico de los pesos (kg) se aplicó ANOVA+Tukey. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el software InStat 3.0 (Graph Pad Software, CA, EE. UU.).

IV.4.3 Resultados

En la Tabla IV.12 se puede observar la infectividad (L3/kg pasto) del verdeo de Ray-Grass y la pastura de *Agropyrum* a lo largo del ensayo. Los valores de L3/kg de pasto demuestran las amplias diferencias de infectividad entre ambos recursos forrajeros, especialmente en el día 45 post-tratamiento, en el cual el valor de L3 obtenido fue 27 veces mayor en la pastura que en el verdeo.

Tabla IV.12. Infectividad (L3/kg pasto) del verdeo de Ray-Grass (Rodeo A) y la pastura de *Agropyrum* (Rodeo B) al inicio del ensayo (día 0), y a los 45 y 91 días post-tratamiento.

Momento del ensayo	Larvas 3/kg pasto ¹	
	Verdeo	Pastura
Día 0	136	300
Día 45	285	7769
Día 91	-*	2148

¹Concentración de L3/kg de pasto estimada según Fiel, Steffan y Ferreyra (2011).

*Al día 91 no se tomó muestra del verdeo ya que fue imposible acceder al potrero por cuestiones climáticas.

En la Tabla IV.13 se pueden observar los resultados de la Reducción del Conteo de Huevos (RCH), tanto las totales (indiferenciadas) como para los géneros *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp. y *Ostertagia* spp. de los diferentes tratamientos antihelmínticos evaluados. Todos los valores de la RCH se muestran con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Considerando que RCH inferiores al 90% indican presencia de resistencia antihelmíntica, el 42% y 67% para IVM y MXD, respectivamente, confirmaron la presencia de nematodos resistentes a ambos antihelmínticos en el establecimiento. Los géneros parasitarios resistentes a ambos antihelmínticos fueron *Haemonchus* spp. y *Cooperia* spp. Tanto RBZ, como la combinación IVM+RBZ demostraron una eficacia adecuada, con RCH de 97 y 99%, respectivamente. A pesar que la eficacia clínica total más alta la obtuvo la combinación IVM+RBZ, no se observaron diferencias estadísticas entre este grupo y el RBZ administrado solo ($P>0.05$). Sin embargo, la combinación fue el único tratamiento que alcanzó un 100% de eficacia clínica contra *Haemonchus* spp. resistente a IVM y a MXD. La eficacia del tratamiento combinado sobre *Haemonchus* spp. fue significativamente ($P<0.05$) mayor a la observada luego de la administración de RBZ en forma única. Todos los tratamientos controlaron efectivamente a *Ostertagia* spp.

Tabla IV.13. Porcentajes de reducción de los conteos de huevos (RCH) (indiferenciados) para *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp. y *Ostertagia* spp. (basado en el recuento de huevos dividido en cada género según la proporción de los mismos en los coprocultivos antes y después de cada tratamiento) con sus intervalos de confianza superior e inferior (95%) 19 días después de la administración subcutánea de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg), moxidectin (MXD, 0.2 mg/kg), ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) e IVM+RBZ (misma dosis) a terneros naturalmente parasitados.

	RCH¹ Día 19			
	(IC)			
	IVM	MXD	RBZ	IVM+RBZ
RCH total	42%^a (12-61)	67%^a (47-79)	97%^b (95-99)	99%^b (99-99)
<i>Cooperia</i> spp.	74% ^a	78% ^a	98% ^b	99% ^b
<i>Haemonchus</i> spp.	0% ^a	36% ^a	97% ^b	100% ^c
<i>Ostertagia</i> spp.	100% ^a	100% ^a	96% ^a	99% ^a

¹RCH estimado según Coles *et al.*, (1992), Vet. Parasitol., 44:35-44.

RCH con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Con respecto al impacto productivo, la Fig. IV.10 presenta los pesos vivos promedios de los terneros del rodeo A (verdeo-maíz diferido) a lo largo del presente ensayo, y la Tabla IV.14 las ganancias totales de peso vivo a los 91 días post-tratamiento del mismo rodeo. A pesar que el peso vivo promedio inicial (día 0) fue similar para todos los grupos, se observaron diferencias en su evolución durante el período del ensayo dependiendo del tratamiento antihelmíntico. De hecho, la ganancia total de peso vivo (GPV) a los 91 días fue significativamente menor (P<0.05) para los grupos IVM y MXD en comparación a la GPV de lo animales tratados con la combinación IVM+RBZ, el cual mostró ser el tratamiento más efectivo. De esta forma, al comparar las GPV a los 91 días entre los antihelmínticos que presentaron resistencia y el tratamiento más eficaz (IVM+RBZ), las pérdidas por resistencia ascendieron a 17.5 kg para IVM y a 5.9 kg para MXD. Si se consideran estos kg perdidos, las pérdidas económicas por resistencia a IVM alcanzaron los U\$S

36 por animal en el período de 91 días. En el caso del MXD, el cual presentó menor nivel de resistencia (con mayor % RCH), los dólares perdidos por animal fueron 12 para el mismo período.

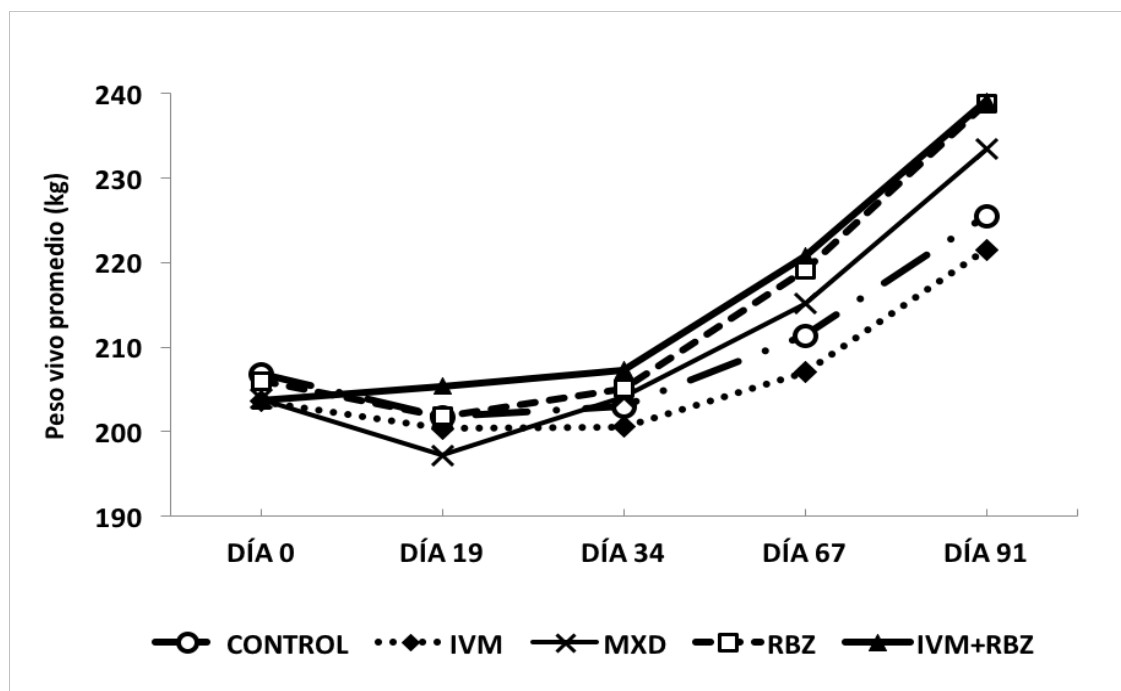


Figura IV.10. Rodeo verdeo-maiz diferido (A). Peso vivo promedio (kg) después de la administración subcutánea de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg), moxidectin (MXD, 0.2 mg/kg), ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) e IVM+RBZ (misma dosis) a terneros naturalmente parasitados.

Tabla IV.14. Rodeo verdeo-maiz diferido (A). Efecto sobre el peso vivo (promedio \pm DE) de la administración subcutánea de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg), moxidectin (MXD, 0.2 mg/kg), ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) e IVM+RBZ (misma dosis) a terneros naturalmente parasitados.

Grupo Experimental	Peso promedio Día 0 (kg \pm DE)	Peso promedio Día 91 (kg \pm DE)	Ganancia total de peso vivo 0-91 días (kg \pm DE)
CONTROL	207 \pm 9,2 ^a	225 \pm 12 ^a	18.6 \pm 12 ^a
IVM	204 \pm 8,2 ^a	221 \pm 13 ^a	17.9 \pm 11 ^a
MXD	204 \pm 7,3 ^a	233 \pm 16 ^{ac}	29.5 \pm 13 ^{ac}
RBZ	206 \pm 8,2 ^a	239 \pm 13 ^{bc}	32.9 \pm 13 ^{bc}
IVM+RBZ	204 \pm 7,9 ^a	239 \pm 15 ^{bc}	35.4 \pm 15 ^{bc}

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$).

La Fig. IV.11 presenta los pesos vivos promedios de los terneros del rodeo B (pastura) a lo largo del presente ensayo (91 días), y la Tabla IV.15 las ganancias totales de peso vivo a los 91 días post-tratamiento del mismo rodeo. Nuevamente el peso vivo promedio inicial fue similar para todos los grupos, pero, al igual que en el rodeo verdeo-maíz diferido, los tratamientos eficaces (RBZ e IVM+RBZ) alcanzaron ganancias de peso vivo a los 91 días mayores que el control y los tratamientos ineficaces (IVM y MXD). Aunque en este caso la cantidad de kg perdidos fue menor a la observada para los animales del rodeo A, una vez más, y a pesar que cambió el recurso forrajero, se pueden observar pérdidas productivas por la presencia de resistencia antihelmíntica. De esta forma, al comparar las ganancias de peso vivo a los 91 días entre los antihelmínticos que presentaron resistencia y el tratamiento más eficaz (IVM+RBZ), las pérdidas atribuidas al fenómeno de resistencia antihelmíntica ascendieron a 7.7 kg para IVM y a 4.8 kg para MXD. Con respecto al impacto económico en el Rodeo B, al ser menores los kg perdidos por animal, las pérdidas económicas también fueron menores que las observadas en el Rodeo A. De hecho, las pérdidas económicas ascendieron a U\$S 16 debido a la resistencia a IVM y U\$S 10 debido a la resistencia a MXD (ambos valores expresados por animal en 91 días).

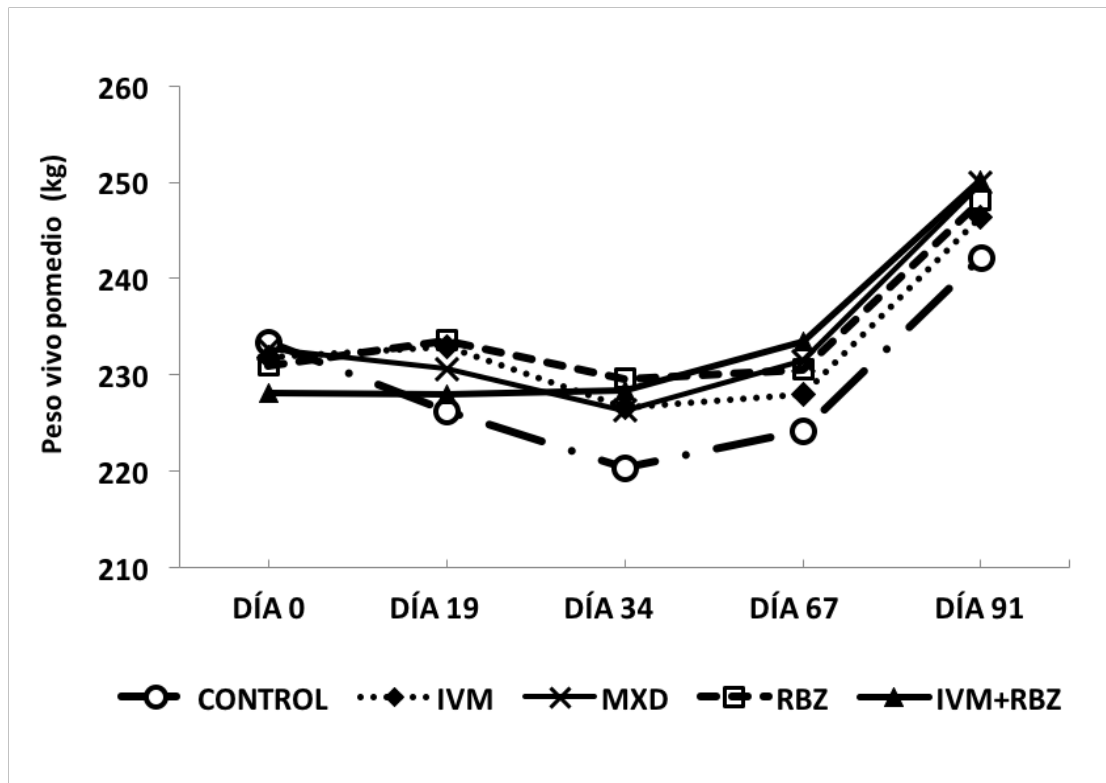


Figura IV.11. Rodeo pastura (B). Peso vivo promedio (kg) después de la administración subcutánea de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg), moxidectin (MXD, 0.2 mg/kg), ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) e IVM+RBZ (misma dosis) a terneros naturalmente parasitados.

Tabla IV.15. Rodeo pastura (B). Efecto sobre el peso vivo (promedio \pm DE) de la administración subcutánea de ivermectina (IVM, 0.2 mg/kg), moxidectin (MXD, 0.2 mg/kg), ricobendazole (RBZ, 3.75 mg/kg) e IVM+RBZ (misma dosis) a terneros naturalmente parasitados.

Grupo Experimental	Peso promedio Día 0 (kg \pm DE)	Peso promedio Día 91 (kg \pm DE)	Ganancia total de peso vivo 0-91 días (kg \pm DE)
CONTROL	233 \pm 14 ^a	242 \pm 17 ^a	8.8 \pm 12,3 ^a
IVM	232 \pm 14 ^a	246 \pm 15 ^{ac}	14.4 \pm 9,3 ^{ac}
MXD	232 \pm 11 ^a	249 \pm 16 ^{ac}	17.3 \pm 12,9 ^{ac}
RBZ	231 \pm 14 ^a	248 \pm 16 ^{ac}	17.6 \pm 9,6 ^{ac}
IVM+RBZ	231 \pm 14 ^a	250 \pm 12 ^{bc}	22.1 \pm 6,5 ^{bc}

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P < 0.05$).

Discusión (Línea de Investigación 3)

La resistencia antihelmíntica se define como una disminución en la eficacia de un antihelmíntico frente a poblaciones parasitarias que normalmente son susceptibles al mismo (Sangster y Gill, 1999). El fracaso terapéutico asociado a resistencia antihelmíntica tiene una importancia económica de enorme trascendencia mundial, siendo particularmente relevante en Argentina, dado que se ha observado resistencia en el 95.2% de 62 establecimientos ganaderos de producción de carne distribuidos en 7 provincias argentinas (Cristel *et al.*, 2017). El principal antihelmíntico implicado en el fenómeno de resistencia es la IVM, detectándose la misma en el 93.5% de los establecimientos, seguida por el RBZ en el 27.9% de los establecimientos; mientras que se encontró resistencia múltiple a IVM y RBZ en el 26.2% de los establecimientos. El LEV es el único antihelmíntico que aún no tiene reporte de resistencia en bovinos en Argentina (Cristel *et al.*, 2017). El contexto actual de resistencia obliga a implementar una integración del conocimiento fármaco-parasitológico en el control de las parasitosis, priorizando el uso racional de los antihelmínticos con el fin de asegurar un control parasitario sustentable. El conocimiento de la relación fármaco-parásito-hospedador en el modelo bovino desarrollado en esta Línea de Investigación, permitió caracterizar los elementos involucrados en los procesos farmacocinético y farmacodinámico tras la administración de un antihelmíntico en forma única o combinada, en bovinos.

Los estudios fármaco-parasitológicos desarrollados en esta Tesis Doctoral estuvieron dirigidos a profundizar en el conocimiento con el objetivo de optimizar el control de los nematodos GI en bovinos. Se buscó generar conocimiento original de utilidad para optimizar el control químico de los nematodos gastrointestinales bovinos, en un contexto crítico de resistencia parasitaria.

IV.1 Caracterización de potenciales interacciones farmacocinéticas farmacodinámicas para la combinación ivermectina-ricobendazole en diferentes escenarios de resistencia-susceptibilidad

Las combinaciones de fármacos han sido exitosas en tratamientos de diferentes áreas de la medicina humana y veterinaria. Cincuenta años atrás ya se habían demostrado las ventajas de las combinaciones en la terapéutica del cáncer (Goldin y Mantel, 1957) y la tuberculosis (Conn *et al.*, 1959). A partir del creciente problema de resistencia antihelmíntica en los sistemas de producción bovina, las combinaciones antihelmínticas podrían lograr un control efectivo de

nematodos GI, especialmente retrasando el desarrollo de resistencia y controlando poblaciones parasitarias resistentes (Geary *et al.*, 2012). El uso de las combinaciones antihelmínticas ha sido ampliamente explorado en ovinos (Anderson *et al.*, 1988; Alvarez *et al.*, 2008; Entrocasso *et al.*, 2008; McKenna, 2010; Geurden *et al.*, 2012; Suarez *et al.*, 2014), pero mucho menos se conoce acerca del manejo de la resistencia antihelmíntica en bovinos (Sutherland y Leathwick, 2011). La percepción que la resistencia en los parásitos de bovinos se desarrollaría más lento es claramente incorrecta y ésta debe ser considerada una amenaza para la productividad animal en los sistemas pastoriles de producción de carne bovina (Sutherland y Leathwick, 2011; Leathwick y Besier, 2014). El desafío para los productores de ganado bovino será maximizar las ventajas del manejo de la resistencia proveniente de la experiencia ganada con los rumiantes menores, como por ejemplo la amplia aceptación de las combinaciones antihelmínticas como una herramienta para manejar la resistencia (Leathwick y Besier, 2014). Sin embargo, se deben considerar las posibles interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas que pueden ocurrir entre los componentes activos o los excipientes al administrar una combinación. El presente experimento evaluó las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas de IVM y RBZ luego de su uso combinado en diferentes escenarios representativos de la situación real de la resistencia antihelmíntica en los establecimientos ganaderos comerciales de la Argentina.

Ivermectina y RBZ son dos de los antihelmínticos más ampliamente utilizados en Argentina. Estos fármacos presentan mecanismos de acción diferentes, por lo que pueden ser combinados para controlar nematodos GI en bovinos. La corta persistencia de RBZ no evitaría que el componente de mayor duración seleccione parásitos resistentes durante el período de concentraciones subóptimas en la “cola” de la curva de eliminación de IVM; pero esta situación no es diferente de lo que se experimentaría si la IVM se usara sola (Geary *et al.*, 2012). En el presente estudio, no se observaron interacciones farmacocinéticas luego de la administración SC combinada de IVM y RBZ en terneros. Actualmente existe poca información disponible acerca de las posibles interacciones farmacocinéticas luego de la co-administración de fármacos antihelmínticos en bovinos. Alvarez *et al.* (2008) encontraron que algún tipo de interacción farmacocinética entre ABZ e IVM ocurrió luego de su co-administración a ovinos y una interacción similar fue demostrada por Suarez *et al.* (2014) después de la administración combinada de IVM+albendazole+LEV. Estos reportes demostraron que, en ovinos, la interacción entre fármacos administrados conjuntamente puede inducir cambios en el comportamiento farmacocinético de cualquiera de las moléculas involucradas. Aunque las interacciones farmacocinéticas se han estudiado menos en bovinos, Leathwick *et al.* (2016) encontraron una

biodisponibilidad de abamectina (ABA) significativamente mayor luego de la administración oral de la combinación ABA+LEV que después de su administración única en bovinos. En contraste, el mismo estudio no encontró diferencias entre el tratamiento único y combinado en las concentraciones plasmáticas de LEV. En el presente experimento no se observaron cambios significativos en los perfiles plasmáticos de RBZ/metabolitos ni de IVM luego de su coadministración SC en bovinos. Por lo tanto, los resultados farmacocinéticos obtenidos en el presente experimento concuerdan con los datos previamente informados para otras combinaciones antihelmínticas en bovinos (Cromie *et al.*, 2006), e indicarían que la disposición plasmática de cada molécula no estuvo influenciada por la presencia de la otra.

Con respecto al estudio parasitológico, en el mismo se buscó contemplar la mayor cantidad de escenarios posibles de susceptibilidad/resistencia a IVM y a RBZ factibles de encontrar en los establecimientos ganaderos comerciales de bovinos en Argentina. El nivel pre-existente de resistencia a cada uno de los antihelmínticos en la combinación es uno de los requisitos más importantes para maximizar la habilidad de una combinación, tanto para manejar la resistencia existente como para retrasar su desarrollo. Desde un punto de vista teórico, el uso de antihelmínticos en forma combinada va necesariamente a retardar el desarrollo de resistencia, si cada uno de los principios activos incluidos en la formulación presenta una eficacia cercana al 100% (Bartram *et al.*, 2012). Esta sería la situación ideal para el uso de una combinación nematodocida, y los resultados del presente estudio lo confirman. En un escenario totalmente susceptible, mientras que las eficacias clínicas de IVM y RBZ administrados en forma individual fueron del 92% y 98% respectivamente, su administración simultánea alcanzó una eficacia del 100%. De hecho, este fue el único escenario de los evaluados donde tanto la administración de IVM sola, RBZ solo o la combinación IVM+RBZ demostraron eficacias clínicas mayores al 90% contra todos los géneros parasitarios (*Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. y *Oesophagostomum* spp.). Por lo tanto, el uso de los productos combinados no induciría selección de resistencia antihelmíntica en este escenario. Este es uno de los mayores desafíos para todo el sistema de producción bovina: estar un paso por delante de la resistencia antihelmíntica.

En la actualidad la presencia de poblaciones parasitarias totalmente susceptibles a los diferentes principios activos es escasa, dado que la resistencia está ampliamente difundida en Argentina. Como fuera mencionado anteriormente, el principal antihelmíntico implicado en el fenómeno de resistencia es la IVM, detectándose la misma en el 93.5% de los establecimientos (Cristel *et al.*, 2017). A partir de esta situación, el presente estudio evaluó la eficacia clínica de la combinación IVM+RBZ en tres escenarios con diferentes niveles de resistencia a IVM (alto, medio y bajo),

los cuales fueron todos susceptibles a RBZ. En todos los casos, la combinación de ambos antihelmínticos logró la mayor eficacia clínica, la cual fue equivalente a la respuesta terapéutica obtenida luego del tratamiento con la administración única de RBZ. En estos tres escenarios IVM administrada en forma única falló para controlar *Cooperia* spp., mostrando eficacias por debajo del 90% en todos los casos. Estos hallazgos se corresponden con la información en la bibliografía, en la cual éste es el género más frecuentemente involucrado en la resistencia a IVM en bovinos en Argentina (Anziani *et al.*, 2001; Fiel *et al.*, 2001; Suarez y Cristel, 2007). Sin embargo, en el escenario de alta resistencia a IVM (48% RCH), este antihelmíntico también falló para controlar *Haemonchus* spp., resultados que coinciden con los reportados por Anziani *et al.* (2004) y Cristel *et al.* (2017), quienes también reportaron tanto *Haemonchus* spp. como *Cooperia* spp. resistentes a IVM. Aunque la información publicada en bovinos es bastante escasa, algunos resultados preliminares indican que la combinación de lactonas macrocíclicas y LEV fue altamente efectiva en minimizar la supervivencia de nematodos resistentes (Smith, 2014; Leathwick *et al.*, 2016). Aunque el presente estudio no mostró una mejora significativa en las RCH entre el RBZ solo y la combinación IVM+RBZ en los tres escenarios de resistencia planteados anteriormente (Tabla IV.4), las eficacias clínicas observadas para la combinación fueron las esperadas, es decir aquellas derivadas de efectos antihelmínticos aditivos entre los dos fármacos (Bartram *et al.*, 2012). Un efecto aditivo ocurre cuando el efecto combinado de dos fármacos es igual a la suma de sus efectos individuales (Prescott, 2000). Este efecto ha sido demostrado en algunos estudios realizados en ovinos con combinaciones antihelmínticas (Anderson *et al.*, 1988, 1991; Mckenna, 1990b; Entrocasso *et al.*, 2008). Los niveles pre-existentes de resistencia a IVM podrían explicar la falta de una mejor eficacia en el tratamiento combinado, ya que como se indica en los estudios de modelación (Dobson *et al.*, 2011; Leathwick, 2012; Leathwick *et al.*, 2012) la clave para alcanzar el éxito en el uso de la combinaciones antihelmínticas requiere su administración previamente a que se desarrolle resistencia (eficacia menor al 70%) a uno o más de sus componentes. Sin embargo, al comparar las eficacias contra los diferentes géneros en el escenario de alta resistencia a IVM, notablemente la combinación IVM+RBZ fue el único tratamiento que alcanzó una eficacia clínica del 100% contra *Haemonchus* spp. resistente a IVM. Esto significa que el grupo combinado logró una mayor eficacia contra las poblaciones de parásitos resistentes ($P < 0.05$) que cualquiera de los componentes antihelmínticos utilizados solos, logrando eliminar a la totalidad de los parásitos resistentes a IVM. Una situación similar, con una mayor eficacia para la combinación, se presentó en el escenario resistente a IVM y a RBZ. Los resultados de la RCH indicaron la presencia de nematodos resistentes a IVM (54% de RCH) y a RBZ (84% de RCH). Sin embargo,

la combinación IVM+RBZ fue el único tratamiento que obtuvo una RCH mayor al 90%, logrando una eficacia clínica total del 98%. De hecho, se encontraron diferencias significativas en los conteos de HPG post-tratamiento entre la combinación y el tratamiento único con RBZ ($P < 0.05$). En este caso IVM administrada en forma única, al igual que en el resto de los escenarios, falló para controlar *Cooperia* spp, alcanzado una eficacia clínica de tan sólo un 14%, lo que indicó la presencia de *Cooperia* spp. resistente a IVM. En forma similar, RBZ falló para controlar *Cooperia* spp. (74% de RCH), por lo que se puede decir que en el presente establecimiento, a diferencia de los escenarios analizados anteriormente, existe *Cooperia* spp. resistente tanto a IVM como a RBZ. En tanto la combinación de ambos antihelmínticos, éste fue el único tratamiento que logró una eficacia adecuada contra este género multi-resistente, alcanzando una RCH del 97% contra *Cooperia* spp., la cual fue significativamente diferente a la RCH del tratamiento con RBZ solo ($p < 0.05$). Con respecto al nematodo GI *Ostertagia* spp., en los escenarios que presentaron resistencia a RBZ, este antihelmíntico falló para controlarlo. Estos resultados coinciden con los géneros resistentes tanto a IVM como a RBZ reportados en Argentina por Cristel *et al.* (2017). Estos autores también reportaron presencia de resistencia tanto a IVM como a RBZ en el 26.2% de los establecimientos estudiados en Argentina, coincidente con el escenario de resistencia antihelmíntica múltiple evaluado en la presente Tesis. Lamentablemente, la presencia de resistencia a más de un antihelmíntico en un mismo establecimiento es cada vez más frecuente. Se ha sugerido que en los establecimientos ganaderos con presencia de poblaciones de nematodos resistentes, el uso de combinaciones podría ser una alternativa para mejorar el control químico parasitario (Anderson *et al.*, 1988; Bartram *et al.*, 2012; Geary *et al.*, 2012). En general, y como sucedió en el escenario de alta resistencia a IVM, la información disponible parece indicar que el efecto aditivo es la interacción que más predomina luego del uso combinado de fármacos antihelmínticos (Lanusse *et al.*, 2014). Sin embargo, en un contexto de resistencia múltiple a IVM y a RBZ, la combinación de ambos logró un 98% de reducción del conteo de huevos, lo cual representa una eficacia clínica superior a lo esperado por un efecto aditivo, es decir el efecto obtenido tras la administración conjunta de ambos antihelmínticos fue mayor al esperado tras la simple suma de sus efectos individuales (Prescott, 2000). En forma similar, Miller y Craig, (1996) también describieron un efecto mayor al aditivo entre el fenbendazole (FBZ) y el LEV, ya que obtuvieron una RCH del 62% al implementar dicha combinación contra *H. contortus* multi-resistente; comparado con una RCH del 1% y 23% (FBZ y LEV, respectivamente) cuando se administraron en forma individual. De todas maneras en los estudios realizados en este experimento, el uso de compuestos combinados alcanzó una mayor reducción en el conteo de huevos en cualquiera de los escenarios, con una menor cantidad de parásitos resistentes vivos luego del tratamiento, por lo que se produciría un aumento de

la dilución con la población parasitaria en refugio. De esta forma, el desarrollo de resistencia antihelmíntica sería más lento luego de la administración del tratamiento combinado (Leathwick *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se observó que la excreción de huevos a la pastura fue mucho menor luego de tratamiento combinado. Como se muestra en Tabla IV.5, el grupo control fue el que excretó la mayor cantidad de huevos por día (32 millones aprox.), seguido por el grupo IVM sola (9 millones aprox.), RBZ solo (900.000 aprox.) y finalmente el tratamiento combinado con 200.000 huevos por día. Por lo tanto, se puede decir que el número de huevos excretados a la pastura por parte de los grupos tratados decreció al 29.9 % (IVM sola), 2.9% (RBZ solo) y 0.8% (IVM+RBZ) al ser comparados con el grupo control no tratado. Además, los animales tratados con RBZ excretaron 3.7 veces más huevos a la pastura que aquellos tratados con la combinación. De acuerdo a estos resultados, el uso de la combinación daría lugar a una menor contaminación de la pastura que el tratamiento con RBZ solo. A pesar que la relación entre la contaminación de la pastura y la infestación resultante es muy variable e influenciada por el clima (Michel, 1976), esta ventaja “epidemiológica” observada después del tratamiento combinado no es despreciable y podría impactar en la evolución de la resistencia, dado que la infestación inicial de las pasturas tendrá un efecto en la siguiente generación de L3, y por lo tanto en el riesgo de enfermedad parasitaria (Michel, 1976). Fiel *et al.* (2012), hallaron que las larvas en la pastura originadas por la contaminación durante el verano y el otoño tienen un importante impacto productivo en terneros menores a un año, además de ser responsables de la contribución de larvas en primavera; el fin del verano y otoño serían momentos adecuados para aprovechar la ventaja de la combinación en la menor excreción de huevos. Sin embargo, es importante considerar que estos huevos excretados a la pastura por lo animales tratados con la combinación IVM+RBZ son resistentes a ambos antihelmínticos. Con respecto a esto, Leathwick (2013) demostró que cada mecanismo de resistencia está asociado a un “costo de adaptación” o “fitness cost”, de forma tal que en parásitos con múltiples genes resistentes, el “fitness cost” resulta aditivo y repercute en la supervivencia de las larvas resistentes. En este contexto, los parásitos sobrevivientes a la combinación IVM+RBZ serían los menos aptos. De hecho, se considera que si el “fitness cost” es suficientemente alto, la resistencia no se desarrollaría. El desarrollo de resistencia es retrasado tanto por el “fitness cost” (por ser resistente) como por la proporción de la población parasitaria que no es expuesta al tratamiento (Leathwick, 2013). En este contexto, aunque el uso racional de las combinaciones antihelmínticas es una herramienta prometedora en el control parasitario, es importante aclarar que en ausencia de un adecuado nivel de refugio de parásitos susceptibles, el uso de antihelmínticos en

forma combinada tienen el potencial de seleccionar nematodos multi-resistentes (Leathwick y Besier, 2014). De esta manera, se reduciría el espectro de opciones de antihelmínticos para controlar los parásitos GI. Leathwick (2013) demostró que aumentando la proporción de la población parasitaria en refugio siempre se retrasa el desarrollo de resistencia, al igual que cuando se utilizan combinaciones. Leathwick *et al.* (2012) demostraron en un trabajo a campo que utilizando combinaciones de antihelmínticos y aumentando el refugio de nematodos sin selección (dejando algunos animales sin tratar) se retrasa el desarrollo resistencia antihelmíntica. La importancia del refugio es más evidente en las estrategias conocidas como “tratar y mover” (“treat and move”), ya que aplicar antihelmínticos y mover los animales a una pastura “limpia” en ausencia de refugio es una práctica de alto riesgo para la selección de resistencia antihelmíntica (Waghorn *et al.*, 2009). Contemplando la importancia del refugio (Van Wyk, 2001), es imprescindible considerar la proporción disponible del mismo previamente a aplicar la combinación IVM+RBZ evaluada en la presente Tesis Doctoral. La excepción a esta premisa sería el escenario en el cual la combinación logre el 100% de eficacia clínica, ya que como menciona Michel (1976), si terneros “limpios” son llevados a una pastura “limpia” el sistema se mantendrá lo suficiente “limpio” como para que la parasitosis no ocurra. Como fuera mencionado anteriormente, esta sería la situación ideal para utilizar una combinación con el objetivo de retrasar el desarrollo de resistencia, pero lamentablemente no la más habitual de encontrar en condiciones de campo. No obstante, tanto modelos de simulación como ensayos a campo han demostrado que el uso de los antihelmínticos en forma combinada logran en todos los casos una frecuencia final del gen de resistencia menor (hasta incluso reversión hacia susceptibilidad) que si se aplican en forma separada, siempre y cuando hubiera algunos nematodos en refugio (Leathwick *et al.*, 2012; Leathwick *et al.*, 2015).

En general, la combinación IVM+RBZ obtuvo un efecto terapéutico aditivo en bovinos bajo los diferentes escenarios naturales de campo evaluados en la presente Tesis Doctoral. De hecho, la combinación fue altamente efectiva en controlar *Haemonchus* spp. resistente a IVM, y *Cooperia* spp. resistente a IVM y a RBZ. La combinación logró que una menor cantidad de parásitos resistentes sobrevivan luego del tratamiento combinado, lo que aumenta la dilución con la población parasitaria en refugio. Sin embargo, las combinaciones antihelmínticas, requieren conocimiento y un uso prudente (Hosking *et al.*, 2013). Por lo tanto, las mismas deberían ser sólo una parte más de un paquete integral de estrategias de manejo de la resistencia antihelmíntica (Leathwick *et al.*, 2015). De hecho, los resultados de la presente Tesis Doctoral con respecto a la combinación IVM+RBZ confirman que la comprensión del estado de susceptibilidad y/o

resistencia en cada establecimiento comercial es esencial para optimizar el control parasitario. La presencia de nematodos resistentes, la proporción de la población parasitaria en refugio y el nivel de infección de los animales son aspectos importantes que deben tenerse en cuenta antes de implementar combinaciones nematocidas a campo. Sólo de esta manera se puede asegurar que las combinaciones nematocidas sean una herramienta sustentable para el control de parásitos en determinados escenarios. Este es el primer reporte sobre la evaluación fármaco-parasitológica de la combinación IVM+RBZ bajo una situación real de producción bovina.

IV.2 Caracterización de potenciales interacciones farmacocinéticas- farmacodinámicas para la combinación ricobendazole-levamisole en un escenario susceptible

El principal objetivo del presente estudio fue evaluar las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas luego del uso combinado de RBZ y LEV en bovinos bajo condiciones naturales de campo. Los resultados del estudio parasitológico en invierno llevaron a la necesidad de realizar el estudio de eficacia clínica en una estación del año (primavera) con diferente integración de las poblaciones parasitarias presentes en los animales.

Debido a los bajos niveles de resistencia parasitaria a RBZ y LEV en bovinos registrados en Argentina (Cristel *et al.*, 2017), estos antihelmínticos son ampliamente utilizados en el país, y podrían ser usados en combinación para el control de nematodos GI en bovinos. Cuando se administra una combinación antihelmíntica, se debe considerar que pueden existir interacciones farmacocinéticas desfavorables entre los componentes activos o los excipientes/vehículos de la formulación. Como resultados del presente estudio se observaron que los perfiles plasmáticos de concentración vs. tiempo obtenidos tanto para RBZ como para LEV fueron similares a los reportados en estudios previos en bovinos (Dorn y Federmann, 1976; Lanusse *et al.*, 1998). Luego de la administración SC de RBZ (3.75 mg/kg) se obtuvieron valores de C_{max} de 0.64 ± 0.15 µg/mL y de ABC_{0-∞} de 8.48 ± 2.61 µg.h/mL, concordantes con los informados previamente por Lanusse *et al.* (1998). Por otro lado, luego de la administración SC de LEV (8 mg/kg), el pico de concentración plasmática fue similar al descrito previamente por Dorn y Federmann (1976). Con respecto a los perfiles farmacocinéticos de las moléculas incluidas en la combinación, uno de los requisitos postulados para retrasar el desarrollo de resistencia es que los antihelmínticos tengan una duración similar del efecto antiparasitario (“time to kill”) (Bartram *et al.*, 2012). El fundamento de esta condición es garantizar que ambos antihelmínticos actúen en

forma combinada a lo largo de su permanencia en el organismo. En este sentido, tanto RBZ como LEV fueron detectados en plasma de bovinos durante las 24 horas posteriores al tratamiento (Fig. IV.4). Otra ventaja que presenta la combinación utilizada en este experimento es que tanto RBZ como LEV presentan una vida media corta, en comparación a las moléculas de vida media larga (ej. lactonas macrocíclicas) por lo cual se evita la exposición de la población parasitaria (incluyendo parásitos adultos y L3 ingeridas por los animales tratados) al antihelmíntico durante periodos prolongados, lo que resulta en una menor presión de selección en comparación a un fármaco con una vida media prolongada (Dobson *et al.*, 1996; Prichard, 2002).

En el presente estudio, no se observaron interacciones farmacocinéticas adversas después de la administración SC combinada de RBZ y LEV en terneros. La falta de interacción se demostró con los resultados del ensayo farmacocinético, en el cual no hubo diferencias estadísticas en ninguno de los parámetros farmacocinéticos entre la administración individual o combinada (Tabla IV.6). Además, las curvas de concentración plasmática vs. tiempo obtenidas después de ambos tratamientos (individual y combinado) fueron muy similares (Figuras IV.5 y IV.6). En contraste, algunos estudios en ovinos demostraron interacción entre antihelmínticos co-administrados (Alvarez *et al.*, 2008; Suarez *et al.*, 2014). Aunque se dispone de una información limitada sobre las interacciones farmacocinéticas entre fármacos nematocidas en bovinos, Leathwick *et al.* (2016) encontraron que la biodisponibilidad de ABA fue significativamente mayor después de la combinación oral de ABA+LEV comparado a lo observado luego de su administración como único fármaco. Por el contrario, en el mismo estudio no se encontraron diferencias en las concentraciones plasmáticas de LEV luego del tratamiento único y combinado. Estos resultados son similares a los observados en la presente Tesis, donde los cambios en los parámetros farmacocinéticos de LEV luego de su administración combinada con RBZ en terneros no fueron significativos. Del mismo modo, en el experimento IV.1 de la presente Tesis Doctoral, no se observaron interacciones farmacocinéticas después de la administración SC combinada de IVM y RBZ en bovinos. Los perfiles farmacocinéticos de RBZ y LEV observados en el presente experimento demuestran que la administración simultánea de ambos antihelmínticos en bovinos no modificó el comportamiento farmacocinético de ninguno de los fármacos implicados.

En concordancia con los resultados del estudio farmacocinético, no se encontraron diferencias significativas en la eficacia clínica total entre el tratamiento único y combinado. Sin embargo, la combinación fue el único tratamiento que logró una eficacia clínica del 100% en invierno. Al

igual que en el Experimento IV.1 (IVM+RBZ), se observaron efectos aditivos luego del tratamiento combinado RBZ+LEV. Este efecto aditivo, fue reportado tanto en ovinos (Anderson *et al.*, 1988; Mckenna, 1990b; Entrocasso *et al.*, 2008), como en bovinos (Mason y McKay, 2006; Smith, 2014; Leathwick *et al.*, 2016). En el estudio actual llevado a cabo en un escenario susceptible, se observó una reducción significativa en el conteo total de huevos de nematodos 15 días después del tratamiento, la cual confirma la alta eficacia de RBZ y LEV después de sus administraciones individuales en invierno (96% y 99%, respectivamente). Uno de los requisitos más importantes para maximizar el éxito de las combinaciones, son los niveles preexistentes de resistencia a cada uno de los antihelmínticos en la combinación (Bartram *et al.*, 2012). Un escenario donde la población de nematodos sea mayoritariamente susceptible representa la situación ideal para implementar combinaciones de fármacos (Leathwick *et al.*, 2012) y poder estar “un paso por delante” de la resistencia antihelmíntica. Como se indicó en los estudios de modelización (Dobson *et al.*, 2011; Leathwick, 2012; Leathwick *et al.*, 2012), la clave para el uso exitoso de combinaciones antihelmínticas sería su administración antes que se desarrolle una resistencia significativa (eficacia <70%) a uno o más de los componentes activos, como la situación planteada en el presente experimento. A diferencia de los resultados obtenidos en invierno, la eficacia clínica total para el tratamiento combinado en primavera cayó al 96%. Del mismo modo, las RCH de RBZ y LEV administrados en forma individual disminuyeron a 95 y 93%, respectivamente. La mayor presencia de *Ostertagia* spp. en primavera (Fig. IV.7) podría explicar dicha disminución de las eficacias clínicas en esta estación en comparación con el invierno. Esta interpretación se basa en la menor eficacia de LEV contra *Ostertagia* spp. comparado al resto de los nematodos GI de los bovinos (Hart *et al.*, 1969) y a la falta de eficacia de éste compuesto sobre larvas cuatro (L4) inhibidas de dicho género (Williams, 1991), cuya presencia es predominante en los animales parasitados naturalmente durante la primavera (Fernández *et al.*, 1999). Los hallazgos de este estudio son consistentes con los publicados por Williams *et al.* (1991), donde la eficacia de LEV fue menor en presencia de L4 inhibidas de *Ostertagia* spp. Por otra parte, en estudios previos se demostró que la eficacia de RBZ contra *Ostertagia* spp. es menor al 100%, reportándose eficacias de 95.7 y 50% después de la administración SC de RBZ a 7.5 mg/kg y a 3.5 mg/kg, respectivamente (Steffan *et al.*, 2002).

La parasitosis GI en bovinos siempre involucra diferentes géneros parasitarios. Podría esperarse que el tratamiento con diferentes antihelmínticos administrados simultáneamente conduzca a un control parasitario eficaz, ya que los parásitos que sobreviven a un compuesto activo incluido en la combinación podrían ser eliminados por la actividad del otro compuesto activo (Geary *et al.*,

2012; Lanusse *et al.*, 2015). De hecho, en el estudio actual, la eficacia contra *Haemonchus* spp. fue del 90% (RBZ), 100% (LEV) y 100% (RBZ+LEV), mientras que la eficacia contra *Ostertagia* spp. fue del 100% (RBZ), 98% (LEV) y 100% (RBZ+LEV). Cabe resaltar que la combinación fue el único tratamiento que logró el 100% de eficacia clínica contra ambos géneros de parásitos, *Haemonchus* spp. y *Ostertagia* spp. en invierno. Lograr este nivel de eficacia sería la situación ideal dado que la selección de resistencia antihelmíntica no debería ocurrir si un tratamiento antihelmíntico alcanza el 100% de eficacia contra todos los géneros de nematodos presentes (Lanusse *et al.*, 2014). De esta forma, definitivamente se retrasaría el desarrollo de resistencia. Por el contrario, como se mencionó anteriormente, la mayor presencia de *Ostertagia* spp. en primavera, impidió que la combinación alcanzara el 100% de eficacia clínica contra todos los géneros de nematodos, como lo observado en invierno. Estos hallazgos demuestran que los géneros parasitarios presentes de acuerdo a la época del año pueden afectar la eficacia final de los tratamientos combinados.

El presente estudio demostró que el tratamiento RBZ+LEV puede ser una combinación válida en bovinos, ya que no se observaron interacciones farmacocinéticas adversas después del tratamiento combinado. Además, esta combinación incluye dos antihelmínticos de acción corta y, por lo tanto, posee baja presión de selección para el desarrollo de resistencia antihelmíntica. Más importante aún, aunque se observó una alta eficacia clínica cuando RBZ y LEV se administraron solos, la combinación fue el único tratamiento que alcanzó una eficacia clínica del 100% en invierno. En este sentido, en un escenario donde la población de nematodos es susceptible, el uso de la combinación podría ser útil para tratamientos de cuarentena o estrategias “treat and move”. De hecho, Dobson *et al.* (2001) indicaron que la clave principal para retrasar la aparición de resistencia antihelmíntica en una situación real de campo es lograr la mayor eficacia posible en animales tratados. Sin embargo, los resultados de las RCH en primavera demostraron la importancia de conocer la epidemiología de los diferentes géneros de parásitos GI en terneros infectados naturalmente. Para concluir, las potenciales ventajas terapéuticas del tratamiento antihelmíntico combinado deben evaluarse con cautela, especialmente teniendo en cuenta la población de nematodos implicados y las posibles interacciones farmacocinéticas entre los fármacos incluidos en una combinación. En sistemas de producción bovina donde algunas moléculas individuales, como RBZ y LEV, aún mantienen su mayor eficacia, el uso combinado de ambos antihelmínticos puede ser una herramienta importante para retrasar la resistencia. En una situación ideal, si un tratamiento antihelmíntico alcanza el 100% de eficacia, como en el

presente estudio, la selección de resistencia antihelmíntica no debería nunca ocurrir (Lanusse *et al.*, 2014).

IV.3 Efecto de la vía de administración en la eficacia de ivermectina sobre nematodos susceptibles y resistentes

El presente experimento tuvo como objetivo evaluar el comportamiento farmacocinético y la eficacia clínica contra nematodos GI susceptibles y resistentes después de la administración oral y subcutánea de IVM en bovinos.

Actualmente, el uso de fármacos antihelmínticos continúa siendo una de las herramientas clave en el control parasitario, por lo que, ante la falta de desarrollo de nuevas moléculas, es imprescindible buscar nuevas estrategias para optimizar su uso en el control parasitario, tanto para manejar como retrasar el desarrollo de resistencia antihelmíntica. En este sentido, se han propuesto tanto el uso de combinaciones de antihelmínticos (estrategia discutida en los experimentos anteriores), como diferentes alternativas que mejoren la exposición del parásito al fármaco, como puede ser el cambio en la vía de administración del mismo (Gopal *et al.*, 2001; Lloberas *et al.*, 2012). El aumento de la biodisponibilidad del fármaco en el sitio de acción es una herramienta farmacológica que puede cooperar para incrementar la eficacia clínica y, de esta forma, retrasar el desarrollo de la resistencia antihelmíntica. La potencia de la mayoría de los antihelmínticos depende no solo de su afinidad por un receptor específico (sitio de acción) sino también de las propiedades cinéticas que le facilitan alcanzar concentraciones efectivas del fármaco en el sitio de acción (Lanusse *et al.*, 2014). Las lactonas macrocíclicas son fármacos antiparasitarios de amplio espectro ampliamente utilizados para controlar endo y ectoparásitos, siendo la IVM la más representativa y utilizada de este grupo químico. Desde un punto de vista práctico, la vía de administración determina la farmacocinética del antihelmíntico (Lifschitz *et al.*, 2017). De hecho y como ha sido reportado previamente, la disponibilidad plasmática de la IVM es mayor luego de su aplicación SC comparado con el tratamiento oral en ovinos (Marriner *et al.*, 1987; Imperiale *et al.*, 2004; Lloberas *et al.*, 2012). Los resultados del presente experimento en bovinos concuerdan con los reportados en ovinos previamente, ya que la disponibilidad sistémica de la IVM (estimada como ABC_{0-LOQ}) obtenida después de la administración SC (421 ± 70.3 ng.d/mL) fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a la observada luego del tratamiento oral (121.5 ± 32.2 ng.d/mL) (Tabla IV.9). A pesar que son escasos los estudios en bovinos que comparen ambas vías de administración, de

forma similar a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, Leathwick y Miller (2013) encontraron niveles plasmáticos de MXD significativamente superiores luego del tratamiento SC comparado con el tratamiento oral en bovinos. Se ha demostrado que la IVM se une (adsorbe) en forma inespecífica al material particulado de la ingesta, lo cual limita la absorción del fármaco hacia la circulación sistémica luego de su administración oral (Lifschitz *et al.*, 2005). Esta sería una probable explicación de la menor disponibilidad sistémica de la IVM administrada por vía oral, en comparación con la administración SC. En contraste a lo observado en plasma, en el presente estudio se obtuvieron concentraciones fecales de IVM mayores luego del tratamiento oral (Fig. IV.9). Las mayores diferencias en las concentraciones entre ambas vías de administración fueron detectadas hasta los cuatro días post-tratamiento (gráfico añadido en Fig. IV.9). De hecho, el $ABC_{\text{parcial}}(0-4)$ fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en heces obtenidas de terneros tratados por vía oral (9170 ± 1985 ng.d/g) comparada con la obtenida de los tratados por vía SC (1527 ± 507 ng.d/g). Las mayores concentraciones de IVM excretadas en materia fecal reflejan las mayores concentraciones alcanzadas a nivel GI después de la administración oral. Resultados que coinciden con los reportados en ovinos por Lloberas *et al.* (2012), quienes encontraron concentraciones de IVM significativamente más altas en el contenido abomasal después del tratamiento intrarruminal (IR- equivalente al oral-) comparado a la inyección SC. Estas concentraciones más altas medidas en el contenido abomasal después de la administración IR, explicaron la mayor cantidad de IVM cuantificada en *H. contortus* adultos recuperados de ovinos tratados por la misma vía (Lloberas *et al.*, 2012). Por lo tanto, se puede decir que la acumulación del fármaco en los parásitos “blanco” está directamente relacionada con la concentración del antihelmíntico presente en el entorno donde se encuentran los nematodos, que en este caso es el tracto GI. En este sentido, la acción antihelmíntica depende de la habilidad del fármaco activo en alcanzar los receptores específicos dentro de los parásitos GI (Lanusse *et al.*, 2015); y como fuera mencionado anteriormente, la bibliografía demuestra que la entrada transcuticular es la más importante para el ingreso de antihelmínticos a los nematodos (Ho *et al.*, 1990; Geary *et al.*, 1995). En consecuencia, tanto la entrada del fármaco como su acumulación en los parásitos “blanco” son importantes cuando se busca optimizar la eficacia de un antihelmíntico (Alvarez *et al.*, 2007). Las concentraciones del antihelmíntico alcanzadas a nivel GI son relevantes en términos de la llegada del fármaco a los nematodos localizados a dicho nivel. En consecuencia resultan críticas para la eficacia del mismo, particularmente si los nematodos tienen una susceptibilidad reducida al antihelmíntico.

Los resultados del estudio farmacocinético pueden explicar y/o se relacionan con los hallazgos del estudio parasitológico. Poco después de la introducción de la IVM en el mercado farmacéutico

veterinario, cuando la susceptibilidad de los nematodos era alta, se observaron eficacias equivalentes contra los parásitos GI después de los tratamientos por vía SC y oral en ovinos/caprinos (Lespine *et al.*, 2005). En forma similar, en los establecimientos susceptibles A y B del presente experimento se obtuvieron eficacias clínicas del 93% (SC) y 91% (oral), y del 93% (SC) y 92% (oral), respectivamente, confirmando que ambas vías de administración alcanzaron una eficacia similar contra nematodos GI susceptibles. Sin embargo, después de muchos años de uso excesivo, la resistencia a la IVM está muy extendida (Kaplan, 2004). De hecho, en Argentina la IVM es el principal antihelmíntico implicado en casos de resistencia (93.5%) (Cristel *et al.*, 2017). En este contexto, la selección de la vía de administración puede ser una herramienta farmacológica importante para mejorar la eficacia frente a nematodos resistentes (Lifschitz *et al.*, 2017). En este sentido, en el presente estudio se evaluó la RCH de la IVM luego de su administración por vía oral en bovinos (la única vía utilizada a campo en Argentina es la administración SC). Como se puede observar en la Tabla IV.10, los resultados fueron variables entre los diferentes establecimientos con presencia de nematodos resistentes. En los campos resistentes 1 y 2 se observó una mayor RCH para la vía oral en comparación a la vía SC, aunque sin diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambas vías de administración. Las RCH se incrementaron de 36% (SC) a 63% (oral) en el establecimiento resistente 1, y de 68% (SC) a 81% (oral) en el resistente 2. Similares resultados se obtuvieron en un ensayo con ovinos parasitados con *H. contortus* altamente resistentes a IVM, en el cual la eficacia clínica aumentó de 0% (administración SC) a 40.5% (administración IR) pero sin diferencias significativas entre ambos tratamientos (Lloberas *et al.*, 2012). Fue en ese mismo ensayo en el cual se reportaron concentraciones de IVM significativamente más altas en el tracto GI y dentro de ejemplares adultos de *H. contortus* luego de la administración IR. En el presente estudio, las mayores concentraciones de IVM cuantificadas tras su administración oral en materia fecal, y por ende a nivel GI, determinaron una mayor eficacia clínica en presencia de parásitos resistentes. Resultados similares se obtuvieron con otras LM como ABA y MXD, las cuales incrementaron su eficacia frente a nematodos GI resistentes luego de su administración oral en ovinos (Gopal *et al.*, 2001; Alka *et al.*, 2004). A pesar que son pocos los estudios de eficacia que comparen diferentes vías de administración de LM en bovinos, Leathwick y Miller (2013) reportaron una RCH total significativamente más alta después del tratamiento oral de MXD (91.1%) que luego de su administración SC (55.5%). Se observó una tendencia similar al administrar ABA a bovinos por vía oral y pour-on, con eficacias del 83% y 35%, respectivamente, respaldando nuevamente la ventaja de la administración oral (Leathwick *et al.*, 2016). Sin embargo, no todos son resultados alentadores con respecto a la administración oral, dado que en los establecimientos resistentes 3 y 4 del presente estudio, las eficacias clínicas no mejoraron al

comparar el tratamiento oral con el SC. De hecho, en el campo resistente 3 se obtuvieron RCH totales de 0% (SC) y 0.3% (oral), mientras que en el establecimiento resistente 4, las RCH totales fueron del 40% (SC) y 41% (oral). De forma similar a estos últimos resultados, Galvan *et al.* (2016) también obtuvieron eficacias similares para ambas vías de administración en bovinos, con RCH totales de 40% (SC) y 45% (oral) frente a nematodos GI resistentes.

Frente a la variabilidad en las eficacias presentadas anteriormente, se debe considerar que la parasitosis GI en bovinos siempre involucra diferentes géneros parasitarios. En este sentido, en la Tabla IV.11 se puede observar que a pesar de haber demostrado eficacias totales adecuadas (por arriba del 90%), en los establecimientos susceptibles existe *Cooperia* spp. resistente a IVM. De hecho, en ambos establecimientos (A y B) tanto la vía SC como la oral presentaron RCH por debajo del 90%. Los resultados de las eficacias clínicas contra *Cooperia* spp. demuestran que este género siempre está presente en los casos de resistencia a IVM. Resultados similares obtuvieron Cristel *et al.* (2017), quienes encontraron *Cooperia* spp. resistente en el 100% de los campos donde se observó resistencia a IVM. Es lógico que *Cooperia* spp. sea el principal género involucrado en la resistencia a IVM, ya que es uno de los géneros “dosis limitante” para este antihelmíntico, para el cual se ha fijado la dosis de 0.2 mg/kg (Lanusse *et al.*, 2013). Al comparar los establecimientos resistentes evaluados en el presente ensayo, se encontraron diferencias en los géneros parasitarios resistentes involucrados. De hecho, en los campos resistentes 1 y 2, en los cuales la eficacia total de IVM mejoró luego del tratamiento oral, el único género resistente fue *Cooperia* spp. De forma similar, otros estudios en bovinos también reportaron un aumento de la eficacia luego de la administración oral de IVM/MXD contra *Cooperia* spp. resistente (Pomroy *et al.*, 2004; Leathwick y Miller, 2013). En cambio, en los campos donde ambas vías de administración obtuvieron eficacias similares (resistente 3 y 4), se encontraron tanto *Cooperia* spp. como *Haemonchus* spp. resistentes a IVM (vía SC y oral con RCH por debajo del 50% para ambos géneros parasitarios). Nuevamente estos resultados coinciden con Galvan *et al.* (2016), quienes no encontraron un incremento en la eficacia clínica de la IVM luego de su administración oral frente a *Cooperia* spp. y *Haemonchus* spp. resistentes. Estudios similares en ovinos reportaron resultados variables, ya que mientras Lloberas *et al.* (2012) obtuvieron una mayor eficacia luego del tratamiento oral de IVM contra *H. contortus* resistentes, Barnes *et al.* (2001), no observaron mejoras en la RCH al comparar la administración SC y oral de MXD frente a *H. contortus* resistentes. Con respecto a *Ostertagia* spp., y al igual que lo reportado en estudios similares en bovinos (Leathwick y Miller, 2013; Galvan *et al.*, 2016) ambas vías de administración lograron elevadas eficacias contra este género en todos los escenarios evaluados. Éstos resultados están en concordancia con lo reportado por Cristel *et*

al. (2017), estudio en el cual no encontraron *Ostertagia* spp. resistente a IVM en Argentina. Sin embargo, en otras regiones del mundo como Nueva Zelanda, ya existen reportes en bovinos de *Ostertagia* spp. resistente a IVM (Waghorn *et al.*, 2016). Por esta razón, se vuelve imprescindible hacer un uso racional de este antihelmíntico contra este género en particular en Argentina, para evitar llegar a la situación de resistencia reportada en *Cooperia* spp. y *Haemonchus* spp.

En conjunto, los resultados del presente experimento muestran que la administración oral de IVM puede lograr una mayor eficacia contra los nematodos GI en comparación al tratamiento SC en bovinos. La mejor eficacia relacionada a la vía de administración sólo puede ser observada en presencia de nematodos resistentes. Las mayores concentraciones de IVM alcanzadas a nivel GI (medidas como el fármaco excretado en materia fecal) después de la administración oral en comparación con la SC pueden haber representado una mayor exposición de los nematodos adultos al fármaco. Los resultados obtenidos demuestran que las concentraciones de IVM alcanzadas a nivel GI son relevantes en términos de llegada del fármaco a nematodos de localización GI. Sin embargo, tanto estudios previos como los hallazgos del presente ensayo, confirman que la administración oral de IVM no siempre tiene un impacto en la RCH, ya que lograr una mejor eficacia dependerá del nivel de resistencia y de los géneros involucrados en la misma. Una vez más, queda en evidencia la necesidad de conocer el estado de resistencia de cada establecimiento comercial, antes de aplicar nuevas estrategias para optimizar el control parasitario a campo.

V.4 Impacto productivo de la resistencia antihelmíntica en bovinos

El objetivo del presente trabajo fue evaluar, en un sistema real de producción bovina, el impacto de la resistencia antihelmíntica sobre la productividad de bovinos naturalmente parasitados con nematodos GI resistentes a lactonas macrocíclicas (ivermectina y moxidectin).

Teniendo en cuenta que el objetivo de un sistema de recría e invernada es lograr un adecuado desarrollo del ternero con una aceptable producción de carne, se debe asegurar una óptima ganancia de peso en estos sistemas. Los parásitos GI generan múltiples trastornos digestivos y metabólicos en los animales, los cuales resultan en una baja productividad. En los terneros de invernada esta baja productividad se refleja principalmente, en una menor ganancia de peso (Entrocasso, 1988). Debido a lo mencionado, la parasitosis GI es considerada como una de las enfermedades que mayor impacto económico ocasiona en los sistemas de producción de carne a

nivel mundial (Charlier *et al.*, 2015). En este contexto, un adecuado control parasitario es necesario para asegurar buenos niveles productivos en los sistemas de producción ganadera. Si bien el uso indiscriminado de fármacos antihelmínticos ha llevado al desarrollo de resistencia por parte de los principales géneros parasitarios (Cristel *et al.*, 2017), el uso de los mismos continúa siendo una de las herramientas clave en el control parasitario y la alternativa más práctica para su aplicación “a campo”. Por otro lado, la limitada implementación de sistemas de monitoreo parasitológico “a campo” (para confirmar la necesidad de tratamiento) y la falta de diagnóstico de resistencia en los establecimientos ganaderos, determina que se continúen utilizando antihelmínticos inefectivos. En este contexto, es necesario evaluar el real impacto productivo de un inadecuado control parasitario asociado a la resistencia antihelmíntica bajo condiciones reales de campo.

Considerando que RCH inferiores al 90% indican presencia de resistencia antihelmíntica, el 42% y 67% de RCH totales para IVM y MXD, respectivamente, confirmaron la presencia de nematodos resistentes a ambos antihelmínticos en el establecimiento involucrado en el presente estudio (Tabla IV.13). Los géneros parasitarios resistentes a ambos antihelmínticos fueron *Haemonchus* spp. y *Cooperia* spp. Mientras que *Cooperia* spp. presentó una resistencia moderada (74% y 78% de RCH para IVM y MXD, respectivamente), el aislamiento de *Haemonchus* spp. presente en el establecimiento resultó ser altamente resistente a LM con RCH del 0% y 36% para IVM y MXD, respectivamente. Nuevamente, los hallazgos de ambos géneros parasitarios resistentes a LM coinciden con lo reportado por Cristel *et al.* (2017) en Argentina, como también con los resultados de los experimentos IV.1 y IV.3 de la presente Tesis Doctoral. MXD es considerado en muchos casos una alternativa ante la presencia de nematodos GI resistentes a IVM (Prichard *et al.*, 2012; Lloberas *et al.*, 2013). Sin embargo y en concordancia con los resultados del presente ensayo, la resistencia a dicho compuesto en diferentes regiones del mundo es cada vez más frecuente (Kaplan, 2004; Sutherland y Leathwick, 2011; Leathwick y Miller, 2013). En base a los resultados obtenidos en el experimento IV.1, se decidió utilizar para este estudio la combinación IVM+RBZ como tratamiento antihelmíntico efectivo, dado que la misma no mostró interacciones farmacocinéticas entre ambos antihelmínticos y fue el único tratamiento que logró 100% de eficacia contra *Haemonchus* spp. resistente a IVM. Nuevamente, en el presente establecimiento la combinación fue el único tratamiento que alcanzó un 100% de eficacia clínica contra *Haemonchus* spp. resistente a IVM y a MXD ($P<0.05$). Además, tanto el tratamiento combinado como RBZ administrado sólo obtuvieron mayor RCH ($P<0.05$) comparado a lo observado para IVM y MXD

administrados solos. Tal lo observado en experimentos previos, todos los tratamientos controlaron efectivamente *Ostertagia* spp.

En ambos rodeos (A “verdeo-maíz diferido” y B “pastura”) las diferencias en la RCH se correlacionaron con las diferencias en las GPV. De hecho, la GPV a los 91 días para los grupos IVM y MXD fue similar a la observada en el grupo control (no tratados), y significativamente menor ($P < 0.05$) en comparación a la GPV de los animales tratados con la combinación IVM+RBZ (Tablas IV.14 y IV.15), tratamiento que demostró ser el de mayor eficacia clínica. En forma similar, en ensayos previos el tratamiento combinado demostró mejor performance productiva que la IVM sola en presencia de resistencia (Fazzio *et al.*, 2014; 2016). En el presente estudio se evaluó el impacto de la resistencia sobre la productividad en bovinos en dos escenarios diferentes según su infectividad (L3/kg pasto). Los valores de L3/kg pasto confirman el contexto de alta-reinfección parasitaria en la pastura de *Agropyrum*, la cual llegó a tener una infectividad 27 veces mayor que el verdeo de Ray-Grass (baja re-infección parasitaria).

Al comparar las GPV a los 91 días luego de los tratamientos con antihelmínticos que presentaron resistencia y el tratamiento más eficaz (IVM+RBZ), las pérdidas por resistencia ascendieron a 17.5 kg para IVM y a 5.9 kg para MXD en el caso del Rodeo A de baja re-infección parasitaria (rotación verdeo-maíz diferido). Estos resultados son similares a los reportados por Fazzio *et al.* (2014), donde se observó una diferencia en la GPV de 12 kg (en 126 días) a favor del tratamiento efectivo (RBZ+LEV) en un sistema de engorde a corral en bovinos. En un escenario similar al verdeo-maíz diferido del presente estudio (baja probabilidad de re-infección), Fazzio *et al.*, (2016) observaron que animales parasitados con *Cooperia* spp. y *Haemonchus* spp. altamente resistentes a IVM y tratados con la combinación RBZ+LEV ganaron 12 kg más que aquellos tratados con IVM en 47 días. A diferencia de esto, en presencia *Cooperia* spp. resistente como único género, las pérdidas alcanzan los 6.6 kg en 60 días, luego del tratamiento con IVM a bovinos (Stromberg *et al.*, 2012). El menor impacto productivo en éste caso podría explicarse por la menor patogenicidad de *Cooperia* spp (localización intestinal) en comparación a *Haemonchus* spp. (localización abomasal) (Coop, 1979; Fiel *et al.*, 2013). Tanto en condiciones de feedlot como en la rotación verdeo-maíz diferido utilizada en el presente estudio, las posibilidades de re-infección parasitaria son consideradas muy bajas (Gasbarre, 2014), por lo cual podría asumirse que las diferencias observadas en la GPV descriptas se deben a los nematodos resistentes que sobrevivieron al tratamiento.

A diferencia del recurso forrajero del Rodeo A, la pastura de *Agropyrum* (Rodeo B) presentó una alta probabilidad de re-infección parasitaria, hecho que se asoció a la mayor infectividad de la pastura comparada con el verdeo. En este contexto, al comparar las GPV a los 91 días luego de los tratamientos con los antihelmínticos que presentaron resistencia y el tratamiento más eficaz (IVM+RBZ), las pérdidas por resistencia ascendieron a 7.7 kg para IVM y a 4.8 kg para MXD. Fiel *et al.* (2011) reportaron bajo situaciones de re-infección continua (como las que se producen por el pastoreo directo), y donde el único género resistente fue *Cooperia* spp. una pérdida de 5.2 kg en 90 días luego del tratamiento (ineficaz) con IVM. A pesar que este género es menos patógeno que otros nematodos GI de bovinos, un estudio preliminar en Nueva Zelanda demostró que el control inefectivo de *Cooperia* spp. (atribuido a la resistencia) produjo una diferencia de 14 kg en la GPV en terneros de carne a los 12 meses de edad comparado a un tratamiento eficaz (Sutherland y Leathwick, 2011). Del mismo modo en Brasil, donde existen numerosos reportes de resistencia a LM (Soutello *et al.*, 2007; Condi *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2013) demostraron pérdidas de 10 kg en 112 días de pastoreo luego del tratamiento con doramectina a terneros parasitados con *Cooperia* spp. y *Haemonchus* spp. resistentes a la misma. A pesar que distintos estudios en bovinos en condiciones de pastoreo con re-infección continua, reportan pérdidas de peso atribuidas a resistencia, similares a las encontradas en el presente ensayo, es importante mencionar que las GPV obtenidas en el Rodeo B estuvieron por debajo de las esperadas. Estas bajas GPV para todos los grupos se pueden atribuir al recurso forrajero que se utilizó en este rodeo: *Agropyrum*. El objetivo de utilizar dicho recurso forrajero fue realizar el ensayo sobre una pastura de al menos dos años que asegurara una alta infectividad. Como contrapartida, el ensayo se realizó durante los meses de invierno durante los cuales, en términos generales, esta gramínea presenta baja disponibilidad de forraje (Di Marco *et al.*, 2012; Fernandez Grecco, 2013). En consecuencia, la disponibilidad de materia seca (MS) durante el estudio no fue la ideal, lo cual puede explicar en parte la baja ganancia de peso de los animales. Romera *et al.* (2000) describen ganancias diarias de peso vivo (GDPV) para una pastura de *Agropyrum* de baja disponibilidad de MS de 0.264 kg, la cual se asemeja a la GDPV de los terneros del Rodeo B tratados con la combinación de IVM+RBZ. Sin embargo, la GDPV de los animales del grupo control del mismo rodeo fue sólo de 0.1 kg, la cual se puede atribuir a la baja disponibilidad de forraje más al efecto de los parásitos, ya que estos animales no recibieron tratamiento antihelmíntico. Es necesario considerar que todos los animales experimentales que pastorearon este recurso forrajero de alta re-infección parasitaria, permanecieron bajo las mismas condiciones de pastoreo durante los 91 días de ensayo. En este contexto, las diferencias observadas en la GPV en los diferentes grupos de animales del Rodeo B pueden ser atribuidas al tratamiento antihelmíntico utilizado.

Es difícil obtener una medición precisa del costo de la resistencia antihelmíntica, dado el impacto que factores como la variabilidad en los géneros de nematodos GI presentes, el estado (nutricional, inmunitario, etc.) del hospedador y la proporción del total de parásitos que sobreviven el tratamiento tienen sobre este (Sutherland y Leathwick, 2011). Sin embargo, en el presente ensayo y sin contemplar el antihelmíntico ni el recurso forrajero en particular, los kg de peso perdidos en los animales por la presencia de parásitos resistentes estuvieron en un rango de 4.8 a 17.5 kg por animal en 91 días, los cuales de acuerdo al precio actual de mercado en Argentina (Mercado de Liniers, diciembre 2017), representan pérdidas entre U\$S 10 y 36 por animal durante dicho período. Valores similares fueron reportados por Fazzio *et al.* (2016), con pérdidas aproximadas de U\$S 23 por animal durante los primeros 47 días de engorde a causa de utilizar un antihelmíntico ineficaz frente a parásitos resistentes.

En conclusión, la resistencia antihelmíntica tiene un impacto negativo sobre la productividad de bovinos naturalmente parasitados con nematodos resistentes. La cantidad de kg y u\$s perdidos por utilizar un antiparasitario ineficaz dependen del grado de desarrollo de resistencia y de las condiciones particulares de cada sistema productivo (recurso forrajero, géneros parasitarios resistentes involucrados, implementación de monitoreo parasitológico, entre otros). La característica subclínica de la resistencia antihelmíntica hace más complicado su diagnóstico temprano, especialmente considerando que en la mayoría de los establecimientos comerciales de producción de carne no se realizan sistemáticamente determinaciones del peso vivo para medir la performance productiva y en este contexto no se advierten los costos del parasitismo por nematodos GI y de las consecuencias de utilizar antihelmínticos inefectivos a causa de dicha resistencia (Anziani y Fiel, 2015). El principal inconveniente es que, los bajos niveles de resistencia no son detectados por los productores, quienes continúan con el uso de antihelmínticos que son inefectivos, lo cual compromete el crecimiento de las categorías más susceptibles y la productividad general del rodeo, y favorece la diseminación de parásitos resistentes. Los resultados demuestran que las pérdidas productivas y económicas derivadas de un control parasitario ineficaz dado por la presencia de resistencia son de significativa importancia. Por lo tanto, es imprescindible basar el control parasitario en el diagnóstico de la enfermedad en los animales y de la resistencia en la población parasitaria en cada establecimiento ganadero, considerando cada situación individual. Este trabajo debe ser realizado por profesionales veterinarios capacitados, en busca de lograr un balance adecuado entre productividad y sustentabilidad.

Los estudios fármaco-parasitológicos desarrollados en esta Tesis Doctoral permiten contar con un mayor conocimiento para el control de los nematodos GI en bovinos. Se estudió una herramienta específica (uso de nematodocidas en forma combinada) y se obtuvo conocimiento de valor práctico para la terapéutica antihelmíntica en el contexto actual de resistencia parasitaria en bovinos. El desarrollo de nuevas moléculas es un proceso que requiere una enorme inversión en tiempo y dinero. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas para llevar a cabo un uso sustentable de los antihelmínticos disponibles. En este contexto, esta Tesis Doctoral tiene un impacto directo sobre el sector productivo dado que aporta información original necesaria para optimizar el control parasitario en producción animal, incluyendo el conocimiento de potenciales interacciones cinéticas y/o dinámicas entre fármacos nematodocidas utilizados en forma combinada en bovinos en diferentes escenarios de susceptibilidad/resistencia. Dichos escenarios representan la situación real de muchos establecimientos ganaderos comerciales de la Argentina. Con la transferencia de dicha información a los profesionales veterinarios, se busca dotar a los mismos de una herramienta basada en el conocimiento, que sustente la necesidad de dejar en manos de veterinarios el diseño y aplicación del plan de control parasitario de un establecimiento. La información científica original aquí generada sobre la base de estudios fármaco-parasitológicos integrados, se considera una contribución significativa al sector productivo.

CAPÍTULO V

V.1 Conclusiones generales y principales aportes de esta tesis

Los estudios *ex vivo* realizados en la presente Tesis Doctoral permitieron concluir que la motilidad parasitaria no es un parámetro lo suficientemente sensible y exacto para estudiar la actividad de diferentes fármacos, ya sea para evaluar interacciones farmacodinámicas entre ellos, como para diferenciar parásitos susceptibles de resistentes.

Se encontró una menor acumulación de IVM y ABZSO en *H. contortus* resistente, lo cual podría deberse a limitaciones en la entrada/incremento del eflujo así como un aumento en el metabolismo del fármaco.

En general, la combinación IVM+RBZ obtuvo un efecto terapéutico aditivo en bovinos bajo los diferentes escenarios naturales de campo evaluados en la presente Tesis Doctoral. La combinación fue altamente efectiva en controlar *Haemonchus* spp. resistente a IVM (el tratamiento combinado fue el único en alcanzar una eficacia clínica de 100%), y *Cooperia* spp. resistente a IVM y a RBZ. Tras el uso de la combinación se observó la supervivencia de una menor cantidad de parásitos resistentes, lo que aumentaría la dilución con la población parasitaria en refugio, y por ende retrasaría el desarrollo de resistencia. Con respecto al estudio farmacocinético, los perfiles de concentraciones plasmáticas tanto para IVM como para RBZ no mostraron diferencias luego de su administración en forma única o combinada, lo que indica la ausencia de interacciones farmacocinéticas entre ambos antihelmínticos. Esta es la primera caracterización fármaco-parasitológica de la combinación IVM+RBZ en bovinos.

La combinación RBZ+LEV podría ser una combinación nematodocida válida, dado que ambos antihelmínticos tienen una persistencia en plasma similar y no se observaron interacciones farmacocinéticas adversas luego del tratamiento combinado. Por otro lado, dicha combinación podría ser útil para retrasar el desarrollo de resistencia en un escenario de susceptibilidad. Esto se observó en forma particular en invierno, cuando la combinación alcanzó un 100% de eficacia total por lo que la selección de resistencia antihelmíntica nunca ocurriría.

Las combinaciones antihelmínticas deberían ser sólo una parte más de un “paquete” integral de estrategias de manejo de la resistencia antihelmíntica. De hecho, los resultados de la presente Tesis Doctoral confirman que la comprensión del estado de susceptibilidad y/o resistencia en cada establecimiento comercial es esencial para optimizar el control parasitario. La presencia de nematodos resistentes, la proporción de la población parasitaria en refugio y el nivel de infección de los animales son aspectos importantes que deben tenerse en cuenta antes de implementar

combinaciones nematocidas bajo condiciones de “campo”. Sólo de esta manera se puede asegurar que las combinaciones nematocidas sean una herramienta sustentable para el control de parásitos en determinados escenarios.

En la presente Tesis, se observó una mayor eficacia contra nematodos GI luego de la administración oral de IVM, en comparación al tratamiento SC en bovinos. Sin embargo, la mejor eficacia relacionada a la vía de administración sólo fue observada en presencia de ciertos nematodos resistentes. Las mayores concentraciones de IVM alcanzadas a nivel GI (medidas como el fármaco excretado en materia fecal) después de la administración oral en comparación con la SC pueden haber representado una mayor exposición de los nematodos adultos al fármaco. Los resultados obtenidos demuestran que las concentraciones de IVM alcanzadas a nivel GI son relevantes en términos de llegada del fármaco a nematodos de localización GI. Sin embargo, tanto estudios previos como los hallazgos obtenidos en el marco de la presente Tesis Doctoral, confirman que la administración oral de IVM no siempre tiene un impacto en la RCH, dado que el hecho de alcanzar una mayor eficacia dependerá del nivel de resistencia y de los géneros involucrados en la misma. Una vez más, queda en evidencia la necesidad de conocer el estado de resistencia de las poblaciones parasitarias de cada establecimiento comercial antes de aplicar nuevas estrategias para optimizar el control parasitario a campo.

La resistencia antihelmíntica tiene un impacto negativo sobre la productividad de bovinos naturalmente parasitados con nematodos resistentes. La cantidad de kg de peso y u\$s perdidos por utilizar un antiparasitario ineficaz dependen del grado de desarrollo de resistencia y de las condiciones particulares de cada sistema productivo (recurso forrajero, géneros parasitarios resistentes involucrados, implementación de monitoreo parasitológico, entre otros). Los resultados obtenidos en la Tesis demuestran que las pérdidas productivas y económicas derivadas de un ineficaz control parasitario son de significativa importancia.

Los estudios fármaco-parasitológicos son necesarios para comprender las potenciales ventajas/desventajas de las diferentes alternativas de optimización del control parasitario en un contexto de resistencia antihelmíntica.

V.2 Publicaciones surgidas del trabajo de tesis

V.2.1 Publicaciones científicas

- **Canton, C.**, Ceballos, L., Fiel, C., Moreno, L., Domingo Yagüez, P., Bernat, G., Lanusse, C., Alvarez, L. (2017). Resistant nematodes in cattle: Pharmaco-therapeutic assessment of the ivermectin-ricobendazole combination. *Veterinary Parasitology*, 234, 40–48.
- **Canton, C.**, Ceballos, L., Dominguez, P., Moreno, L., Fiel, C., Bernat, G., Farías, C., Lanusse, C., Alvarez, L. (2017). Pharmaco-parasitological evaluation of the ricobendazole plus levamisole nematocidal combination in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 00, 1-9.

Artículo enviado a *Veterinary Parasitology*:

- **Canton, C.**, Canton, L., Domínguez, P., Moreno, L., Lanusse, C., Alvarez, L., Ceballos, L. Field trial assessment of ivermectin pharmacokinetics and clinical efficacy against susceptible and resistant nematode populations in cattle.

Artículo en preparación:

- **Canton, C.**, Ceballos, L., Fiel, C., Moreno, L., Canton, L., Bernat, G., Lanusse, C., Alvarez, L. The impact of anthelmintic resistance on beef cattle productivity.

V.2.2 Publicaciones de divulgación

- **Canton, C.** (2017) ¿Cuánto le cuesta al productor un inadecuado control parasitario? Periódico MOTIVAR, Julio de 2017. 175: 40-41.
- **Canton, C.**; Buffarini, M.; Alvarez, L.; Domínguez, P.; Cantón, L.; Ceballos, L.; Moreno, L.; Lanusse, C. (2017) Eficacia clínica de la combinación ivermectina-ricobendazole en bovinos en un escenario de resistencia antihelmíntica múltiple. Memoria Técnica 2016-2017 INTA EEA General Villegas, 79-82.

V.2.3 Comunicaciones a congresos

- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Yaguez, P.; Lanusse, C.; Alvarez, L. (2013). Uso de la combinación ivermectina-ricobendazole en bovinos: potenciales interacciones farmacocinéticas-farmacodinámicas. Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, Argentina.
- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Domínguez, P.; Lanusse, C.; Alvarez, L. (2014) Uso combinado de ricobendazole y levamisole en bovinos como estrategia para retardar el desarrollo de resistencia. XXII Jornadas Argentinas y XVII Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria. Santa Fe, Argentina.
- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Lanusse, C.; Alvarez, L. (2014). Uso de modelos ex vivo para comparar la acumulación de fármacos antihelmínticos en parásitos sensibles y resistentes. Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Corrientes, Argentina.
- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Yaguez, P.; Lanusse, C.; Alvarez, L. (2014). Evaluation of the combined use of ivermectin and ricobendazole in cattle: pharmacokinetic and/or pharmacodynamic-interactions. XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Gramado, Brasil.
- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Domínguez, P.; Bernat, G.; Lanusse, C.; Alvarez, L. (2015). Evaluation of ivermectin oral and injectable formulations against susceptible and resistant gastrointestinal nematodes in cattle. 25^o Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology WAAVP. Liverpool, United Kingdom.
- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Domínguez, P.; Bernat, G.; Lanusse, C.; Alvarez, L. (2015). Assessment of the ricobendazole plus levamisole nematocidal combination in cattle. 25^o Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology WAAVP. Liverpool, United Kingdom. (Presentación oral).
- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Domínguez, P.; Bernat, G.; Lanusse, C.; Alvarez, L. (2015). Evaluación de la administración oral e inyectable de

ivermectina sobre parásitos nematodos susceptibles y resistentes. Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Córdoba, Argentina.

- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Dominguez, P.; Bernat, G.; Yaguez, P.; Lanusse, C.; Alvarez, L. (2016). Clinical efficacy and epidemiological impact of the ivermectin-ricobendazole combination in resistant-nematodes infected calves. XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Belém, Brasil. (Presentación oral).

- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Domínguez, P.; Cantón, L.; Bernat, G.; Lanusse, C.1; Alvarez, L. (2017) The impact of anthelmintic resistance on beef cattle productivity. 26° Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology WAAVP. Kuala Lumpur, Malaysia. (Presentación oral).

- **Canton, C.**; Ceballos, L.; Moreno, L.; Fiel, C.; Domínguez, P.; Cantón, L.; Bernat, G.; Lanusse, C.1; Alvarez, L. (2017). Inadequate management of anthelmintic resistance: a real-world case in a cattle commercial farm. 26° Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology WAAVP. Kuala Lumpur, Malaysia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alka, Gopal, R., Sandhu, K. y Sidhu, P. (2004) 'Efficacy of abamectin against ivermectin-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep', *Veterinary Parasitology*, 121, pp. 277–283.
- Alvarez, L., Sanchez, S. 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, pp. 77–86.
- Alvarez, L., Imperiale, F., Sánchez, S., Murno, G. y Lanusse, C. (2000) 'Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep', *Veterinary Parasitology*, 94, pp. 75–89.
- Alvarez, L., Mottier, M. y Lanusse, C. (2007) 'Drug transfer into target helminth parasites', *Trends in Parasitology*, 23, pp. 97–104.
- Alvarez, L., Lifschitz, A., Entrocasso, C., Manazza, J., Mottier, L., Borda, B., Virkel, G. y Lanusse, C. (2008) 'Evaluation of the interaction between ivermectin and albendazole following their combined use in lambs', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31, pp. 230–239.
- Alvarez, L., Suárez, G., Ceballos, L., Moreno, L. y Lanusse, C. (2012) 'Dose-dependent systemic exposure of albendazole metabolites in lambs', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35, pp. 365–372.
- Alvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Canton, C., Lifschitz, A., Mate, L., Ballent, M., Virkel, G. y Lanusse, C. (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, pp. 53–63.
- Alvinerie, M., Sutra, J. F. y Galtier, P. (1993) 'Ivermectin in goat milk after subcutaneous injection', *Veterinary Research*, 24, pp. 417–421.
- Anderson, N., Martin, P. y Jarret, R. (1988) 'Mixtures of anthelmintics: a strategy against resistance', *Australian Veterinary Journal*, 65, pp. 62–64.

Anderson, N., Martin, P. y Jarret, R. (1991) 'The efficacy of mixtures of albendazole sulphoxide and levamisole against sheep nematodes resistant to benzimidazole and levamisole', *Australian Veterinary Journal*, 68, pp. 127–132.

Anziani, O., Zimmermann, G., Guglielmone, A., Vazquez, R. y Suarez, V. (2001) 'Avermectin resistance in *Cooperia pectinata* in cattle in Argentina', *The Veterinary record*, 149, pp. 58–59.

Anziani, O., Suarez, V., Guglielmone, A., Warnke, O., Grande, H. y Coles, G. (2004) 'Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina', *Veterinary parasitology*, 122, pp. 303–306.

Anziani, O. y Fiel, C. (2015) 'Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la argentina', *Revista de Investigación Agropecuaria (INTA)*, 41, pp. 34–46.

Barnes, E., Dobson, R., Stein, P., Le Jambre, L. y Lenane, I. (2001) 'Selection of different genotype larvae and adult worms for anthelmintic resistance by persistent and short-acting avermectin/milbemycins', *International Journal for Parasitology*, 31, pp. 720–727.

Bartram, D., Leathwick, D., Taylor, M., Geurden, T. y Maeder, S. (2012) 'The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes', *Veterinary Parasitology*, 186, pp. 151–158.

Bennett, J. y Pax, R. (1986) 'Micromotility meter: an instrument designed to evaluate the action of drugs on motility of larval and adult nematodes', *Parasitology*, 93, pp. 341–346.

Blackhall, W., Prichard, R. y Beech, R. (2008) 'P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles', *Veterinary Parasitology*, 152, pp. 101–107.

Bolton, S. (1944) *Pharmacological statics. Drugs and Pharmaceutical Sciences*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Borges, F., Almeida, G., Heckler, R., Lemes, R., Onizuka, M. y Borges, D. (2013) 'Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: Effect on weight gain of weaned calves', *Tropical Animal Health and Production*, 45, pp. 723–727.

Bourgeois, B. (2005) 'Methods for assessing pharmacodynamic interactions', en Majkowski, E., Bourgeois, B., Patsalos, P., and Mattson, R. (eds) *Antiepileptic Drugs Combination Therapy and Interactions*. Cambridge University Press, pp. 193–207.

Buckingham, S., Partridge, F. y Sattelle, D. (2014) 'Automated, high-throughput, motility analysis in *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes: Applications in the search for new anthelmintics', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Australian Society for Parasitology, 4, pp. 226–232.

Campbell, W., Fisher, M., Stapley, E., Albers-Schoenberg, G. y Jacob, T. (1983) 'Ivermectin: a potent new antiparasitic agent', *Science*, 221, pp. 823–828.

Campbell, W. (1990) 'Benzimidazoles: veterinary uses', *Parasitology today (Personal ed.)*, 6, pp. 130–133.

Charlier, J., De Waele, V., Ducheyne, E., van der Voort, M., Vande Velde, F. y Claerebout, E. (2015) 'Decision making on helminths in cattle: diagnostics, economics and human behaviour', *Irish Veterinary Journal*, 69, pp. 1–5.

Coles, G., Folz, S. y Tritschler II, J. (1989) 'Motility response of levamisole/benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* larvae', *Veterinary Parasitology*, 31, pp. 253–257.

Coles, G., Bauer, C., Borgsteede, F., Geerts, S., Klei, T. y Taylor, M. (1992) 'World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance', *Veterinary Parasitology*, 44, pp. 35–44.

Coles, G. (2002) 'Sustainable use of anthelmintics in grazing animals', *The Veterinary record*, 151, pp. 165–169.

Condi, G., Soutello, R. y Amarante, A. (2009) 'Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil', *Veterinary Parasitology*, 161, pp. 213–217.

Conn, M., Middlebrook, G. y Russel, W. (1959) 'Combined drug treatment of tuberculosis. I. Prevention of emergence of mutant populations of tubercle bacilli resistant to both streptomycin

and isoniazid in vitro', *Journal of Clinical Investigation*, 38, pp. 1349–1358.

Coop, R., Sykes, A. y Angus, K. (1979) 'The pathogenicity of daily intakes of *Cooperia oncophora* larvae in growing calves', *Veterinary Parasitology*, 5, pp. 261–269.

Courtney, C. y Roberson, E. (1995) 'Antinematodal drugs', en Adams, R. (ed.) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa, USA: Iowa State University Press.

Cristel, S., Fiel, C., Anziani, O., Descarga, C., Cetrá, B., Romero, J., Fernández, S., Entrocasso, C., Lloberas, M., Medus, D. y Steffan, P. (2017) 'Anthelmintic resistance in grazing beef cattle in central and northeastern areas of Argentina — An update', *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 9, pp. 25–28.

Cromie, L., Ferry, M., Couper, A., Fields, C. y Taylor, S. (2006) 'Pharmacokinetics of a novel closantel/ivermectin injection in cattle', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29, pp. 205–211.

De Montigny, P., Shim, J. y Pivinichny, J. (1990) 'Liquid chromatographic determination of ivermectin with trifluoro-acetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 8, pp. 507–511.

Di Marco, O., Agnusdei, M., Recavarren, P. y Arnaude, M. (2012) *Producir exitosamente carne en suelos bajos. Recría en Agropiro y Festuca, Sitio Argentino de Producción Animal*. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/suelos_salinos/20-agropiro_festuca.pdf.

Dobson, R., Lejambre, L. y Gill, J. (1996) 'Management of anthelmintic resistance: Inheritance of resistance and selection with persistent drugs', *International Journal for Parasitology*, 26, pp. 993–1000.

Dobson, R., Besier, R., Barnes, E., Love, S., Vizard, A., Bell, K. and Le Jambre, L. (2001) 'Principles for the use of macrocyclic lactones to minimise selection for resistance', *Australian veterinary journal*, 79, pp. 756–61.

Dobson, R., Hosking, B., Besier, R., Love, S., Larsen, J., Rolfe, P. y Bailey, J. (2011) 'Minimising

the development of anthelmintic resistance, and optimising the use of the novel anthelmintic monepantel, for the sustainable control of nematode parasites in Australian sheep grazing systems’, *Australian veterinary journal*, 89, pp. 160–166.

Dorn, H. y Federmann, M. (1976) ‘Citarin-L Spot-on- A new form of administration of an established anthelmintic [levamisole]’, *Vet. Med. Rev.*, 1, pp. 5–17.

Eddi, C., Caracostantogolo, J., Peña, M., Schapiro, J., Marangunich, L., Waller, P. and Hansen, J. (1996) ‘The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Argentina’, *Veterinary Parasitology*, 62, pp. 189–197.

Eddi, C., Caracostantogolo, J. y Peña, M. (2002) ‘Uso racional de antiparasitarios. Manejo de resistencias’, en Botana, L. (ed.) *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Mc Graw-hill, pp. 559–570.

Edmonds, M., Johnson, E. y Edmonds, J. (2010) ‘Anthelmintic resistance of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* to macrocyclic lactones in cattle from the western United States’, *Veterinary Parasitology*, 170, pp. 224–229.

Egerton, J., Eary, C. y Suhayda, D. (1981) ‘The anthelmintic efficacy of ivermectin in experimentally infected cattle’, *Veterinary Parasitology*, 8, pp. 59–70.

Entrocasso, C., Alvarez, L., Manazza, J., Lifschitz, A., Borda, B., Virkel, G., Mottier, L. y Lanusse, C. (2008) ‘Clinical efficacy assessment of the albendazole–ivermectin combination in lambs parasitized with resistant nematodes’, *Veterinary Parasitology*, 155, pp. 249–256.

Entrocasso, C. (1988) ‘Epidemiology and control of bovine ostertagiasis in South America.’, *Veterinary parasitology*, 27, pp. 59–65.

Fazzio, L., Sánchez, R., Streitenberger, N., Galvan, W., Giudici, C. y Gimeno, E. (2014) ‘The effect of anthelmintic resistance on the productivity in feedlot cattle’, *Veterinary parasitology*, 206, pp. 240–245.

Fazzio, L., Streitenberger, N., Galvan, W., Sánchez, R., Gimeno, E. y Sanabria, R. (2016) ‘Efficacy and productive performance of moxidectin in feedlot calves infected with nematodes

resistant to ivermectin’, *Veterinary Parasitology*, 223, pp. 26-29.

Fernández, A., Fiel, C. y Steffan, P. (1999) ‘Study on the inductive factors of hypobiosis of *Ostertagia ostertagi* in cattle’, *Veterinary Parasitology*, 81, pp. 295–307.

Fernandez Grecco, R. (2013) ‘Dinámica del crecimiento de una pastura de agropiro alargado de acuerdo con la época de fertilización nitrogenada’, *Revista de Investigación Agropecuaria*, 39, pp. 162–168.

Fiel, C., Saumell, C., Steffan, P. y Rodriguez, E. (2001) ‘Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina’, *Veterinary parasitology*, 97, pp. 211–217.

Fiel, C., Steffan, P. y Ferreyra, D. (2011) *Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes: técnicas de diagnóstico e interpretación de resultados*. División Sanidad Animal, Pfizer®.

Fiel, C., Guzmán, M., Steffan, P., Riva, E. y Rodríguez, E. (2011) ‘Cattle worms resistance to Ivermectin treatments: effects on production’, en *Proceedings of the 23th. International of the Conference World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Buenos Aires, Argentina, p. 262.

Fiel, C., Fernández, A., Rodríguez, E., Fusé, L. y Steffan, P. (2012) ‘Observations on the free-living stages of cattle gastrointestinal nematodes’, *Veterinary Parasitology*, 187, pp. 217–22.

Fiel, C., Steffan, P. y Entrocasso, C. (2013) ‘Epidemiología e impacto productivo de nematodos en la pampa húmeda’, en Fiel, C. and Nari, A. (eds) *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su prevención y control*, pp. 29–58.

Folz, S., Pax, R., Thomas, E., Bennett, J., Lee, B. y Conder, G.(1987) ‘Detecting in vitro anthelmintic effects with a micromotility meter’, *Veterinary Parasitology*, 24, pp. 241–250.

Galvan, W., Fazzio, L., Streitenberger, N., Galarza, E., Lizarraga, R., Sanchez, R. y Sanabria, R. (2016) ‘Eficacia de ivermectina 1% por diferentes vías y dosis frente a parásitos gastrointestinales

resistentes', *Veterinaria Argentina*, XXXIII(342).

Gasbarre, L., Smith, L., Lichtenfels, J. y Pilitt, P. (2009) 'The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US', *Veterinary Parasitology*, 166, pp. 281–285.

Gasbarre, L. (2014) 'Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US', *Veterinary Parasitology*, 204, pp. 3-11

Geary, T., Blair, K., Ho, N., Sims, S. y Thompson, D. (1995) 'Biological functions of nematode surfaces', *Mol. Approaches Parasitol.*, 1, pp. 57–76.

Geary, T. (2005) 'Ivermectin 20 years on: Maturation of a wonder drug', *Trends in Parasitology*, 21, pp. 530–532.

Geary, T., Hosking, B., Skuce, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Maeder, S., Holdsworth, P., Pomroy, W. y Vercruyse, J. (2012) 'World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses', *Veterinary Parasitology*, 190, pp. 306–316.

Geurden, T., Hodge, A., Noé, L., Winstanley, D., Bartley, D., Taylor, M., Morgan, C., Fraser, S. J., Maeder, S. y Bartram, D. (2012) 'The efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes of sheep in the UK', *Veterinary Parasitology*, 189, pp. 308–316.

Gibaldi, M. y Perrier, D. (1982) *Pharmacokinetics. 2nd ed, Revised and Expanded*. New York, USA: Marcel Dekker.

Gill, J., Redwin, J., Van Wyk, J. y Lacey, E. (1991) 'Detection of resistance to ivermectin in *haemonchus contortus*', *International Journal for Parasitology*, 21, pp. 771–776.

Giudici, C., Entrocasso, C. y Steffan, P. (2013) 'Biología, fisiología e inmunidad de nematodos gastrointestinales y pulmonares', en *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su prevención y control*, pp. 1–28.

Goldin, A. y Mantel, N. (1957) 'The employment of combinations of drugs in the chemotherapy of neoplasia: a review', *Cancer Research*, 17, pp. 635–654.

Gopal, R., West, D. y Pomroy, W. (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, pp. 133–137.

Hansen, T., Nejsum, P., Friis, C., Olsen, A. y Thamsborg, S. (2014) 'Trichuris suis and Oesophagostomum dentatum show different sensitivity and accumulation of Febendazole, Albendazole and Levamisole In Vitro', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, pp. 1-13.

Hart, J., James, P. y Curr, C. (1969) 'The anthelmintic efficiency of laevo-tetramisole hydrochloride against nematode parasites of sheep and cattle', *Australian Veterinary Journal*, 45, pp. 73–77.

Ho, N., Geary, T., Raub, T., Barsuhn, C. y Thompson, D. (1990) 'Biophysical transport properties of the cuticle and ascaris-suum', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41, pp. 153–165.

Hosking, B., Sager, H., Rolfe, P. y Kaminsky, R. (2013) 'Combination anthelmintics are not magic bullets - they require knowledge and wise use', en *Proceedings of the 24th. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Perth, Australia, p. 315.

Imperiale, F., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Virkel, G. y Lanusse, C. (2004) 'Comparative depletion of ivermectin and moxidectin milk residues in dairy sheep after oral and subcutaneous administration', *Journal of Dairy Research*, 71, pp. 427–433.

Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M. y Afaq, M. (2006) 'Anthelmintic resistance: The state of play revisited', *Life Sciences*, 79, pp. 2413–2431.

Kaplan, R. (2004) 'Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report', *Trends in Parasitology*, 20, pp. 477–481.

Kaplan, R. y Vidyashankar, A. (2012) 'An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance', *Veterinary Parasitology*, 186, pp. 70–78.

- Kerboeuf, D., Blackhall, W., Kaminsky, R. y Von Samson-Himmelstjerna, G. (2003) 'P-glycoprotein in helminths: Function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, pp. 332–346.
- Kotze, A., Le Jambre, L. y 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, pp. 294–305.
- Kotze, A. y Prichard, R. (2016) 'Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. History, Mechanisms and Diagnosis', *Advances in Parasitology*, 93, pp. 397-428
- Lacey, E. (1990) 'Mode of action of benzimidazoles', *Parasitology Today*, 6, pp. 112–115.
- Lanusse, C., Virkel, G., Sanchez, S., Alvarez, L., Lifschitz, A., Imperiale, F. y Monfrinotti, A. (1998) 'Ricobendazole kinetics and availability following subcutaneous administration of a novel injectable formulation to calves', *Research in Veterinary Science*, 65, pp. 5–10.
- Lanusse, C., Alvarez, L., Lifschitz, A. y Suarez, G. (2013) 'Bases farmacológicas de la terapéutica antihelmíntica', en Fiel, C. and Nari, A. (eds) *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicas para su prevención y control*, pp. 223–254.
- Lanusse, C., Alvarez, L. y Lifschitz, A. (2014) 'Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants', *Veterinary parasitology*, 204, pp. 18–33.
- Lanusse, C., Lifschitz, A. y Alvarez, L. (2015) 'Basic and clinical pharmacology contribution to extend anthelmintic molecules lifespan', *Veterinary parasitology*, 212, pp. 35–46.
- Leathwick, D., Moen, I., Miller, C. y Sutherland, I. (2000) 'Ivermectin-resistant *Ostertagia circumcincta* from sheep in the lower North Island and their susceptibility to other macrocyclic lactone anthelmintics', *New Zealand veterinary journal*, 48, pp. 151–154.
- Leathwick, D., Hosking, B., Bisset, S. y McKay, C. (2009) 'Managing anthelmintic resistance: Is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class?', *New Zealand Veterinary Journal*, 57, pp. 181–192.

Leathwick, D. M. (2012) 'Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in combination', *Veterinary Parasitology*, 186, pp. 93–100.

Leathwick, D., Waghorn, T., Miller, C., Candy, P. y Oliver, A. (2012) 'Managing anthelmintic resistance – Use of a combination anthelmintic and leaving some lambs untreated to slow the development of resistance to ivermectin', *Veterinary Parasitology*, 187, pp. 285–294.

Leathwick, D. (2013) 'Managing anthelmintic resistance – Parasite fitness, drug use strategy and the potential for reversion towards susceptibility', *Veterinary Parasitology*, 198, pp. 145–153.

Leathwick, D. y Miller, C. (2013) 'Efficacy of oral, injectable and pour-on formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New Zealand', *Veterinary Parasitology*, 191, pp. 293–300.

Leathwick, D. y Besier, R. (2014) 'The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—Strategies and experiences', *Veterinary Parasitology*, 204, pp. 44–54.

Leathwick, D., Ganesh, S. y Waghorn, T. (2015) 'Evidence for reversion towards anthelmintic susceptibility in *Teladorsagia circumcincta* in response to resistance management programmes', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5, pp. 9–15.

Leathwick, D., Miller, C., Sauermann, C., Candy, P., Ganesh, S., Fraser, K. y Waghorn, T. (2016) 'The efficacy and plasma profiles of abamectin plus levamisole combination anthelmintics administered as oral and pour-on formulations to cattle', *Veterinary Parasitology*, 227, pp. 85–92.

Lespine, A., Alvinerie, M., Pors, I. y Chartier, C. (2005) 'Influence of the route of administration on efficacy and tissue distribution of ivermectin in goat', *Veterinary Parasitology*, 128, pp. 251–260.

Lifschitz, A., Virkel, G., Pis, A., Imperiale, F., Sanchez, S., Alvarez, L., Kujanek, R. y Lanusse, C. (1999) 'Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle', *Veterinary Parasitology*, 86, pp. 203–215.

Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Sutra, J. F., Galtier, P., Alvinerie, M. y Lanusse, C. (2000) 'Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle',

Veterinary Parasitology, 87, pp. 327–338.

Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., Pis, A. y Lanusse, C. (2005) ‘Moxidectin and ivermectin metabolic stability in sheep ruminal and abomasal contents’, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28, pp. 411–418.

Lifschitz, A., Entrocasso, C., Alvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, G., Virkel, G., Borda, B. y Lanusse, C. (2010) ‘Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep’, *Veterinary Parasitology*, 172, pp. 291–298.

Lifschitz, A., Lanusse, C. y Alvarez, L. (2017) ‘Host pharmacokinetics and drug accumulation of anthelmintics within target helminth parasites of ruminants’, *New Zealand Veterinary Journal*, 0, pp. 1–25.

Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Lanusse, C. y Lifschitz, A. (2012) ‘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’, *Experimental Parasitology*, 131, pp. 304–309.

Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Ballent, M., Mate, L., Lanusse, C. y Lifschitz, A. (2013) ‘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’, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3, pp. 20–27.

MAFF (1986) *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*. London: Her Majesty’s Stationery Office.

Marriner, S., McKinnon, I. y Bogan, J. (1987) ‘The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses’, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1, pp. 175–179.

Mason, P. y McKay, C. (2006) ‘Field studies investigating anthelmintic resistance in young cattle on five farms in New Zealand’, *New Zealand veterinary journal*, 54, pp. 318–322.

- Maté, L., Ballent, M., Cantón, C., Ceballos, L., Lifschitz, A., Lanusse, C. y Alvarez, L. (2017) 'Further evidence of P-glycoprotein involvement in resistance to ivermectin in adult stages of *Haemonchus contortus*', en *26^o Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology WAAVP*. Kuala Lumpur, Malaysia, p. 417.
- McKenna, P. (1990)a '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, pp. 142–147.
- Mckenna, P. (1990)b 'The use of benzimidazole-levamisole mixtures for the control and prevention of anthelmintic resistance in sheep nematodes : an assessment of their likely effects', *New Zealand Veterinary Journal*, 38, pp. 45–49.
- McKenna, P. (2010) 'Update on the prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in New Zealand', *New Zealand Veterinary Journal*, 58, pp. 172–173.
- Mejía, M., Fernández Igartúa, B., Schmidt, E. y Cabaret, J. (2003) 'Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance?', *Veterinary Research*, 34, pp. 461–467.
- Merino, G., Jonker, J., Wagenaar, E., Pulido, M., Molina, A., Alvarez, A. y Schinkel, A. (2005) 'Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)', *Drug Metabolism and Disposition*, 33, pp. 614–618.
- Mercado de Liniers. Precio de venta categoría terneros. Acceso gratuito disponible en <http://www.mercadodeliniers.com.ar>. Consultado en diciembre, 2017.
- Michel, J. (1976) 'The Epidemiology and Control of some Nematode Infections in Grazing Animals', *Advances in Parasitology*, 14, pp. 355–397.
- Miller, D. y Craig, T. (1996) 'Use of anthelmintic combinations against multiple resistant *Haemonchus contortus* in Angora goats', *Small Ruminant Research*, 19, pp. 281–283.
- Miller, M., Howell, S., Storey, B. y Kaplan, R. (2015) "Inhibition of motility in the L3 stage is a poor phenotype for detecting and measuring resistance to avermectin/milbemycin drugs in

gastrointestinal nematodes”, en *25^o Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology WAAVP*. Liverpool, United Kingdom, p. 237.

Mottier, L., Alvarez, L., Ceballos, L. y Lanusse, C. (2006) ‘Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics’, *Experimental Parasitology*, 113, pp. 49–57.

Nari, A. (2003) ‘Control integrado de parásitos’, en FAO Sanidad y Producción Animal (ed.) *Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina*. Roma, pp. 18–32.

Nari, A., Franchi, M., Rizzo, E., Marmol, E. y Mautone, G. (2000) ‘Evaluación de un programa de control de nematodos gastrointestinales en ovinos’, *Medidas para dilatar la aparición de resistencia antihelmíntica. Serie FPTA-INIA*, 1, pp. 5–20.

Perrier, D. y Mayersohn, M. (1982) ‘Non-compartmental determination of the steady-state volume of distribution for any mode of administration’, *Journal of Pharmaceutical Science*, 71, pp. 372–373.

Pomarico, J. A., Di Rocco, H. O., Alvarez, L., Lanusse, C., Mottier, L., Saumell, C., Arizaga, R., Rabal, H. y Trivi, M. (2004) ‘Speckle interferometry applied to pharmacodynamic studies: Evaluation of parasite motility’, *European Biophysics Journal*, 33, pp. 694–699.

Pomroy, W., West, D., Scott, I. y Adlington, B. (2004) ‘The differential efficacy of moxidectin and ivermectin given by different routes against ivermectin-resistant *Cooperia* in cattle’, en *Proc. 34th Seminar, The Soc. of Sheep and Beef Cattle Vet. N. Z. Vet. Assoc*, pp. 63–66.

Prescott, J. (2000) ‘Antimicrobial drug action and interaction: an introduction’, en Prescott, J. F., Baggot, J. D., and Walker, R. D. (eds) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Iowa: Iowa State Press, pp. 3–11.

Preston, S., Jabbar, A., Nowell, C., Joachim, A., Ruttkowski, B., Cardno, T., Hofmann, A. y Gasser, R. (2016) ‘Practical and low cost whole-organism motility assay: A step-by-step protocol’, *Molecular and Cellular Probes*, 30, pp. 13–17.

Prichard, R. (2002) ‘Resistance Against Macrocyclic Lactones’, en Vercruysse, J. and Rew, R. S.

(eds) *Macrocyclic Lactones Antiparasitic Therapy*, pp. 163–182.

Prichard, R., Hall, C., Kelly, J., Martin, I. y Donald, A. (1980) ‘The problem of anthelmintic resistance in nematodes’, *Australian Veterinary Journal*, 56, pp. 239–251.

Prichard, R. y Roulet, A. (2007) ‘ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development’, *Parasitology*, 134, p.p. 1123-1132.

Prichard, R., Ménez, C. y Lespine, A. (2012) ‘Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity’, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, pp. 134–153.

Puttachary, S., Trailovic, S., Robertson, A., Thompson, D., Woods, D. y Martin, R. (2013) ‘Derquantel and abamectin: effects and interactions on isolated tissues of *Ascaris suum*’, *Molecular and biochemical parasitology*, 188, pp. 79–86.

Roberts, F. y O’sullivan, P. (1950) ‘Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle’, *Crop Pasture Science*, 1, pp. 99–102.

Robertson, S. y Martin, R. (1993) ‘Levamisole- activated single- channel currents from muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*’, *British Journal of Pharmacology*, 108, pp. 170–178.

Romera, A., Gartía, G., Marino, M. y Agnusdei, M. (2000) ‘Efecto de la asignación forrajera sobre la ganancia de peso de vaquillonas de recría y la utilización del forraje en pasturas dominada por agropiro durante otoño-invierno’, in *XVIa Reunión Latinoamericana de Producción Animal*. Montevideo.

Sangster, N. y Gill, J. (1999) ‘Pharmacology of anthelmintic resistance’, *Parasitology Today*, 15, pp. 141–146.

Shah, V., Midha, K. y Dighe, S. (1992) ‘Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies’, *Pharmaceutical Research*, 9, pp. 588–592.

Smith, G. (1990) ‘Chemotherapy: future problems’, en Warren, K. (ed.) *Hookworm Disease: Current Status and New Directions*. London, U.K.: Taylor & Francis, pp. 291–303.

Smith, L. (2014) 'Combination anthelmintics effectively control ML-resistant parasites; a real-world case history', *Veterinary Parasitology*, 204, pp. 12–17.

Smout, M., Kotze, A., McCarthy, J. y Loukas, A. (2010) 'A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000885>.

Soutello, R., Seno, M. y Amarante, A. F. T. (2007) 'Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil', *Veterinary Parasitology*, 148, pp. 360–364.

Steffan, P., Fiel, C., Ferreyra, D. y Monfrinotti, A. (2002) 'Eficacia del ricobendazole –vía subcutánea- contra los nematodos gastrointestinales del bovino', *Revista de Investigación Agropecuaria*, 31, pp. 89–101.

Storey, B., Marcellino, C., Miller, M., Maclean, M., Mostafa, E., Howell, S., Sakanari, J., Wolstenholme, A. y Kaplan, R. (2014) 'Utilization of computer processed high definition video imaging for measuring motility of microscopic nematode stages on a quantitative scale: "The Worminator"', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4, pp. 233–243.

Stromberg, B. (1997) 'Environmental factors influencing transmission', *Veterinary parasitology*, 72, pp. 247-256.

Stromberg, B., Gasbarre, L., Waite, A., Bechtol, D., Brown, M., Robinson, N., Olson, E. y Newcomb, H. (2012) 'Cooperia punctata: Effect on cattle productivity?', *Veterinary Parasitology*, 183, pp. 284–291.

Suarez, G., Alvarez, L., Castells, D., Berretta, C., Bentancor, S., Fagiolino, P. y Lanusse, C. (2013) 'Pharmaco-therapeutic evaluation of the closantel-moxidectin combination in lambs', en *Proceedings of the 24th. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Perth, Australia, pp. 620.

Suarez, G., Alvarez, L., Castells, D., Moreno, L., Fagiolino, P. y Lanusse, C. (2014) 'Evaluation of pharmacological interactions after administration of a levamisole, albendazole and ivermectin triple combination in lambs', *Veterinary parasitology*, 201, pp. 110–119.

- Suarez, V. y Cristel, S. (2005) 'Mínimo uso de antihelmínticos y manejo forrajero en el control de los nematodos bovinos en la Región Semiárida Pampeana', en *Resistencia a los Antiparasitarios Internos en Argentina. FAO Producción y Sanidad Animal*, pp. 95–102.
- Suarez, V. and Cristel, S. (2007) 'Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina', *Veterinary Parasitology*, 144, pp. 111–117.
- Sutherland, I. y Leathwick, D. (2011) 'Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?', *Trends in Parasitology*, 27, pp. 176–181.
- Waghorn, T., Leathwick, D., Rhodes, A., Jackson, R., Pomroy, W., West, D. y Moffat, J. (2006) 'Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand', *New Zealand veterinary journal*, 54, pp. 278–282.
- Waghorn, T., Leathwick, D., Miller, C y Atkinson, D. (2008) 'Brave or gullible: Testing the concept that leaving susceptible parasites in refugia will slow the development of anthelmintic resistance', *New Zealand Veterinary Journal*, 56, pp. 158–163.
- Waghorn, T., Miller, C., Oliver, A. y Leathwick, D. (2009) 'Drench-and-shift is a high-risk practice in the absence of refugia', *New Zealand Veterinary Journal*, 57, pp. 359–363.
- Waghorn, T., Miller, C. y Leathwick, D. (2016) 'Confirmation of ivermectin resistance in *Ostertagia ostertagi* in cattle in New Zealand', *Veterinary Parasitology*, 229, pp. 139–143.
- Williams, J. (1991) 'Efficacy of albendazole, levamisole and fenbendazole against gastrointestinal nematodes of cattle, with emphasis on inhibited early fourth stage *Ostertagia ostertagi* larvae', *Veterinary Parasitology*, 40, pp. 59–71.
- Williams, J., Knox, J., Marbury, K., Swalley, R. y Eddi, C. (1991) 'Efficacy of levamisole against *Ostertagia ostertagi* in Louisiana cattle during maturation of inhibited larvae (September) and during minimal inhibition (December/January)', *Veterinary Parasitology*, 40, pp. 73–85.
- Wolstenholme, A., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G. y Sangster, N. (2004) 'Drug resistance in veterinary helminths', *Trends in Parasitology*, 20, pp. 469–476.

Wolstenholme, A. y Martin, R. (2014) 'Anthelmintics - From Discovery to Resistance', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4, pp. 218–219.

Van Wyk, J. (2001) 'Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance', *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 68, pp. 55–67.

Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R. y Prichard, R. (1998) 'Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91, pp. 327–335.