



**USO DE LA COMBINACIÓN MOXIDECTINA-LEVAMISOL EN EL CONTROL DE
NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE LOS OVINOS**

Sonia Elisabet Luque

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito

parcial para optar al Título de

DOCTORA en CIENCIAS AGRARIAS

Área de Producción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Balcarce, Argentina

Marzo 2022

USO DE LA COMBINACIÓN MOXIDECTINA-LEVAMISOL EN EL CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE LOS OVINOS

Sonia Elisabet Luque



.....

Dr. Adrián Lifschitz
Director de Tesis



.....

Dr. Luis Ignacio Álvarez
Co-Director de Tesis

USO DE LA COMBINACIÓN MOXIDECTINA-LEVAMISOL EN EL CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE LOS OVINOS

Sonia Elisabet Luque

Aprobada por:


p/a
Prof. Liliana RiarTE, Mag
Secretaría de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAP

.....
Dr. Fernando de Almeida Borges


p/a
Prof. Liliana RiarTE, Mag
Secretaría de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAP

.....
Dra. Fabiana Landoni


p/a
Prof. Liliana RiarTE, Mag
Secretaría de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAP

.....
Dr. Gonzalo Suárez

DEDICATORIA

A José, Ignacia y Emilia, mi mejor equipo.

AGRADECIMIENTOS

- A mi director, *Adrian Lifschitz*, no sólo por seguir de cerca el desarrollo de mi trabajo, sino también por alentar mi formación, acompañar de manera respetuosa y afectuosa todo el proceso.
- A *Ignacio Álvarez*, por darme la oportunidad, por su paciencia y por su confianza.
- A *Carlos Entrocasso*, por su invaluable legado y por contagiarme la pasión por la parasitología.
- A *Mercedes Lloberas* y *Patricia Cardozo* por su compañía diaria y colaboración desinteresada e incondicional.
- A *José, Nacha* y *Memi* por acompañarme, alentarme a seguir y por ser el motor de mis sueños.
- A mis padres por enseñarme que el esfuerzo y la responsabilidad son fundamentales para la superación personal.
- A *Paula Viviani* por su colaboración, paciencia y cordialidad.
- A *Carlos Lanusse* y a todos los integrantes del Laboratorio de Farmacología por abrirme las puertas, por el cariño con que me recibieron y el apoyo a lo largo del desarrollo de esta Tesis.
- A *Guillermo Virkel, Laura Maté, Juan Pedro Lirón, Mariana Ballent, Cristina Farías, Victoria Miró, Germán Fonzo, Laura Moreno, Paula Domínguez* y *Liliana Iriarte* por acompañar cordialmente varios de los procesos metodológicos/administrativos de esta Tesis.
- A *Sergio Dininno* y *Carlos Nieto* por su siempre buena predisposición y su responsabilidad en el manejo de los animales y a *Bernardino Borda* por su colaboración en los trabajos de campo y laboratorio.
- A *Ernesto Odriozola* y a todo el equipo del SDVE, por sus consejos y colaboración.
- A mi cuñado *Severo* porque siempre está para dar una mano y por su mirada crítica que tan bien me hizo para alcanzar este sueño.
- A mis “amigas INTA” y a todos los que de una u otra forma fueron partícipes de esta Tesis.

ÍNDICE

Capítulo I

1. Introducción General.....	2
1.1 Parasitosis gastrointestinales e producción ovina.....	2
1.2 Ciclo biológico.....	3
1.3 Patrones epidemiológicos en el sudeste bonaerense.....	5
1.4 Control de las parasitosis gastrointestinales.....	5
1.4.1 Control farmacológico.....	6
1.5 Resistencia antihelmíntica.....	6
1.5.1 Antecedentes de resistencia antihelmíntica.....	7
1.5.2 Diagnóstico de resistencia antihelmíntica.....	8
1.5.2.1 Pruebas <i>in vivo</i>	8
1.5.2.2 Pruebas <i>in vitro</i>	8
1.5.2.3 Pruebas de biología molecular.....	10
1.6 Estrategias farmacológicas para optimizar la eficacia antihelmíntica.....	11
1.7 Marco teórico, hipótesis y objetivo general.....	12
1.7.1 Objetivo general.....	12
1.7.2 Hipótesis del trabajo.....	12
1.7.3 Desarrollo y organización del trabajo experimental.....	13

Capítulo II

“Caracterización fármaco-parasitológica del tratamiento combinado de MOX y LEV en ovinos parasitados naturalmente con nematodos gastrointestinales resistentes (estudios in vivo)”

2. Introducción.....	15
2.1 Sección Experimental	16
<i>“Caracterización del comportamiento farmacológico de MOX y LEV administrados conjuntamente en ovinos parasitados naturalmente con nematodos gastrointestinales”</i>	
2.1.1 Objetivos específicos... ..	16
2.1.2 Grupo experimentales y tratamientos.....	16
2.1.3 Preparación de los estándares.....	17
2.1.4 Extracción físico-química de moxidectina y análisis cromatográfico.....	17
2.1.5 Extracción físico-química de levamisol y análisis cromatográfico.....	18
2.1.6 Validación de la metodología analítica.....	19

2.1.7 Análisis de los resultados farmacocinéticos.....	19
2.1.8 Resultados.....	20
2.1.8. 1 Validación de métodos cromatográficos de MOX y LEV en plasma.....	20
2.1.8. 2 Cinética plasmática de MOX y LEV.....	22
2.1.9 Principales aportes.....	24
2.2 Sección Experimental 2.....	25
<i>“Caracterización parasitológica y monitoreo de la eficacia de MOX y LEV administrados conjuntamente en ovinos parasitados naturalmente con nematodos gastrointestinales”</i>	
2.2.1 Objetivos específicos.....	25
2.2.2 Metodología experimental.....	25
2.2.3 Análisis estadístico.....	28
2.2.4 Resultados.....	28
2.2.5 Principales aportes.....	36
Capítulo III	
<i>“Caracterización fenotípica y cuantificación de la expresión de Gp-P en la población parasitaria sometida a presión de selección con la combinación MOX+LEV (estudios in vitro)”</i>	
3. Introducción.....	39
3.1 Sección Experimental I.....	40
<i>“Caracterización fenotípica del aislamiento parasitario sometido a presión de selección con la combinación MOX+LEV”</i>	
3.1.1 Objetivo específico.....	40
3.1.2 Metodología experimental.....	41
3.1.3 Test de inhibición de la migración larval (TIML).....	41
3.1.4 Análisis estadístico.....	44
3.1.5 Resultados.....	44
3.1.6 Principales aportes.....	48
3.2 Sección experimental II.....	49
<i>“Cuantificación de la expresión genética del transportador celular Gp-P en H. contortus expuestos in vivo a la combinación MOX+LEV”</i>	
3.2.1 Objetivo específico.....	49
3.2.2 Metodología experimental.....	49
3.2.3 Aislamiento y cuantificación de ARN.....	49
3.2.4 Transcripción reversa. Síntesis de ADNc.....	50

3.2.5 PCR en tiempo real.....	50
3.2.6 Análisis estadístico.....	52
3.2.7 Resultados.....	52
3.2.7. 1 Validación de la eficiencia de la PCR en tiempo real	52
3.2.7. 2 Cuantificación relativa de Gp-P2, Gp-P3 y Gp-P17 en <i>H. contortus</i>	52
3.2.8 Principales aportes.....	55
4. Discusión general.....	56
5. Conclusiones	70
6. Bibliografía.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Parásitos gastrointestinales que afectan a los ovinos.....	3
TABLA 2: Principales parámetros de validación analítica obtenidos para los diferentes analitos estudiados.....	22
TABLA 3: Principales parámetros farmacocinéticos (media \pm DE) obtenidos para moxidectina (MOX) y levamisol (LEV), luego de la administración s.c. de MOX (0,2mg/kg) o LEV (8 mg/kg) de manera individual o combinada en corderos naturalmente infestados nematodos gastrointestinales.....	24
TABLA 4: Porcentaje de reducción (%RCH) y géneros parasitarios recuperados de los cultivos de materia fecal pre y post tratamientos combinados con MOX+LEV en ovinos naturalmente infestados.....	30
TABLA 5: Media aritmética del conteo huevos por gramo de material fecal, amplitud y porcentaje de reducción obtenidos luego del tratamiento individual con MOX o LEV al inicio y al final del período experimental.....	32
TABLA 6: Conteo de parásitos adultos recuperados del tracto gastrointestinal (media aritmética y amplitud) y eficacia (%) obtenida luego del tratamiento combinado con MOX+LEV en corderos naturalmente infestados al inicio y al final del periodo experimental.....	34
TABLA 7: Porcentaje de géneros parasitarios presentes en los aislamientos parasitarios mixtos de inicio y fin del período experimental que fueron utilizados en las pruebas <i>in vitro</i>	44
TABLA 8: Porcentaje de migración larval obtenido para los aislamientos parasitarios mixtos incubados en ausencia de fármacos.....	44
TABLA 9: Parámetros obtenidos del análisis de las curvas dosis-respuesta para MOX y LEV sobre los aislamientos parasitarios de inicio y fin del ensayo <i>in vivo</i> y sobre el aislamiento de <i>H. contortus</i> susceptible.....	47
TABLA 10: Porcentajes de inhibición de la migración larval e intervalos de confianza (95%) obtenidos para las primeras concentraciones ensayas de los fármacos MOX y LEV incubados de manera conjunta.....	48
TABLA 11: Primers y números de acceso de GenBank utilizados para la cuantificación de la expresión relativa por qPCR.....	51
TABLA 12: Principales parámetros obtenidos en la validación de los primers utilizados para la cuantificación de la expresión genética.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales.....	4
FIGURA 2: Curva de calibración obtenida para moxidectina (MOX) en plasma ovino.....	21
FIGURA 3: Curva de calibración obtenida para levamisol (LEV) en plasma ovino.....	21
FIGURA 4: Perfil de concentraciones plasmáticas promedio (+DE) de moxidectina (MOX) luego de su administración SC a 0,2 mg/kg, de manera individual o combinada con levamisol (LEV) (8 mg/kg).....	23
FIGURA 5: Perfil de concentraciones plasmáticas promedio (+DE) de levamisol (LEV) luego de su administración SC a 8 mg/kg, de manera individual o combinada con moxidectina (MOX) (0,2 mg/kg).....	23
FIGURA 6: Representación esquemática de los tratamientos realizados a lo largo de todo el periodo experimental y sus respectivas determinaciones de eficacia.....	26
FIGURA 7: Cantidad de larvas infestantes (L3) por kg de pasto seco recuperadas de los lavados de pasto a lo largo de todo el periodo experimental y porcentaje de géneros presentes en la muestra.....	35
FIGURA 8: Temperaturas medias (°C) y precipitaciones mensuales acumuladas (mm) registradas durante el transcurso del estudio.....	36
FIGURA 9: Sistema de migración utilizado para el test de inhibición de la migración larval.....	43
FIGURA 10: Actividad de moxidectina (MOX) expresada como % de inhibición de la migración larval en los aislamientos parasitarios de inicio y fin del periodo experimental <i>in vivo</i> y en el aislamiento de <i>H. contortus</i> susceptible.....	45
FIGURA 11: Actividad de levamisol (LEV) expresada como % de inhibición de la migración larval en los aislamientos parasitarios de inicio y fin del periodo experimental <i>in vivo</i> y en el aislamiento de <i>H. contortus</i> susceptible.....	46
FIGURA 12: Expresión relativa de la Gp-P2 (Gp-P2) en especímenes adultos de <i>H. contortus</i> recuperados de los corderos del potrero experimental al inicio y al final de los ensayos <i>in vivo</i>	53
FIGURA 13: Expresión relativa de la Gp-P3 (Gp-P3) en especímenes adultos de <i>H. contortus</i> recuperados de los corderos del potrero experimental al inicio y al final de los ensayos <i>in vivo</i> . La línea negra indica el promedio de las mediciones entre grupo.....	54

FIGURA 14: Expresión relativa de la Gp-P3 (Gp-P3) en especímenes adultos de *H. contortus* recuperados de los corderos del potrero experimental al inicio y al final de los ensayos *in vivo*. La línea negra indica el promedio de las mediciones entre grupo.....54

RESUMEN

Las parasitosis gastrointestinales constituyen serias limitantes para la salud, la productividad y el bienestar de rumiantes en sistemas pastoriles. El uso de fármacos es la principal herramienta de control de las parasitosis, sin embargo, en las últimas décadas su utilización masiva y muchas veces sin supervisión profesional, determinó una importante presión de selección sobre las poblaciones parasitarias. Ante el avance del fenómeno de resistencia antihelmíntica, se han propuesto diferentes estrategias de base farmacológica con el objetivo de retardar y/o controlar el desarrollo de la misma. Una de ellas es el uso combinado de fármacos antihelmínticos de similar espectro, pero con diferente mecanismo de acción. Esta herramienta puede contribuir a mejorar la eficacia sobre parásitos resistentes, en especial si los fármacos incluidos en la combinación tienen una elevada eficacia inicial.

En este contexto, el presente trabajo de Tesis abordó el problema de la resistencia antihelmíntica desde un enfoque integrador fármaco-parasitológico. El objetivo de este trabajo fue evaluar las potenciales interacciones farmacocinéticas/farmacodinámicas derivadas del uso combinado de moxidectina (MOX) y levamisol (LEV) en corderos parasitados con nematodos gastrointestinales resistentes, y la evolución de la eficacia del tratamiento combinado después de su uso durante 4 años.

Para ello, la Tesis se organizó en 2 capítulos experimentales, el primero de los cuales se dividió en dos secciones experimentales. En la primera sección experimental se realizó la caracterización farmacocinética de MOX y LEV administrados solos o en forma combinada, a ovinos naturalmente parasitados. En la segunda sección experimental se estudió la eficacia del tratamiento combinado al inicio y al final del periodo de estudio (4 años).

En el segundo capítulo experimental se caracterizó, bajo condiciones *in vitro*, la población parasitaria seleccionada en el primer capítulo experimental. Este capítulo también se dividió en dos secciones experimentales. En la primera de ellas, se realizó la caracterización fenotípica mediante el Test de inhibición de la migración larval frente a MOX y LEV, mientras que en la segunda se realizó la cuantificación de los niveles de expresión relativa de 3 Gp-P en respuesta al tratamiento combinado de MOX y LEV a lo largo de los 4 años de estudio.

No se observaron cambios significativos en la cinética de disposición de MOX y LEV luego de su co-administración en comparación con la administración individual. Se obtuvieron niveles de reducción entre 100% y 77% en la cuenta de huevos para la

administración combinada MOX+LEV durante todo el período experimental, observándose al finalizar el estudio mayores valores para el tratamiento combinado que los obtenidos para cada fármaco de manera individual, lo que podría indicar un efecto aditivo entre MOX y LEV.

La combinación de MOX y LEV evidenció un aumento del efecto observado *in vitro* sobre la migración larval con respecto a las incubaciones individuales y, de igual manera, el tratamiento combinado indujo incrementos en los niveles de expresión de las tres Gp-P evaluadas en los especímenes de *H. contortus* recuperados al finalizar los ensayos *in vivo*, siendo dicho incremento estadísticamente significativo para la Gp-P3 en relación al aislamiento parasitario de inicio.

Como conclusión, el presente trabajo de Tesis aporta información original mediante estudios fármaco-parasitológicos integrados. Dicho conocimiento puede ser de utilidad para diseñar estrategias que permitan prolongar utilidad de los fármacos antihelmínticos en el control parasitario.

Palabras Clave: resistencia antihelmíntica, moxidectina, levamisol, tratamiento combinado.

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes seriously affect health, productivity and animal welfare in grazed based systems. Chemical control is the main used tool for controlling parasites. However, the massive drug administration during the last decades without professional supervision, led to significant selection pressure on parasite populations. Considering the increasing anthelmintic resistance, a variety of pharmacology-based strategies have been proposed for delaying and/or controlling its progression.

Among them appears the combined use of anthelmintic drugs with different mechanism of action, but with the similar spectrum. This tool may contribute to improve efficacy on resistant parasites, especially if the drugs included have a high initial efficacy.

Under these circumstances, the current Thesis addressed the problem of anthelmintic resistance from an integrative drug-parasitological approach. The objective of this work was to evaluate the potential pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions derived from the combined use of moxidectin (MOX) and levamisole (LEV), in lambs parasitized with resistant gastrointestinal nematodes during 4 years of treatments.

The Thesis was divided into 2 experimental chapters. The first one was organized into two experimental sections. The first section included the pharmacokinetic characterization of the individual and combined administration of MOX and LEV in naturally parasitized sheep was carried out. In the second experimental section, the efficacy of the combined treatment was studied at the beginning and at the end of the study period (4 years).

In the second experimental chapter, the parasitic population selected in the first experimental chapter was characterized under *in vitro* conditions. This chapter was also divided into two experimental sections. In the first of them, the phenotypic characterization was carried out using the larval migration inhibition test against MOX and LEV, while in the second, the relative expression levels of 3 P-glycoproteins were quantified in response to MOX and LEV combined treatment throughout the 4 years of study

No significant changes were observed in the disposition kinetics of MOX and LEV after their co-administration compared to individual administration. Levels of fecal eggs count reduction were between 100% and 77% after the combined administration of MOX + LEV during the entire experimental period, observing at the end of the study higher values for the combined treatment than those obtained for each drug individually, which could indicate an additive effect between MOX and LEV.

The combination of MOX and LEV increased the *in vitro* effect observed on larval migration compared to the incubations performed with the individual compound. Besides,

the combined treatment increased the expression levels of the 3 Glycoprotein-P_s evaluated in the *H. contortus* specimens recovered at the end of the *in vivo* tests, being statistically significant the increment for glycoprotein-P₃ compared to the initial isolate.

As a conclusion, the current Thesis provides original information through integrated pharmaco-parasitological studies. Such knowledge can be useful in planning strategies to extend the lifespan of anthelmintic drugs in parasite control.

Key Words: anthelmintic resistance, moxidectin, levamisole, combined treatment.

CAPÍTULO I

1. Introducción general

1. 1 Parasitosis gastrointestinales en producción ovina

Las parasitosis gastrointestinales constituyen serias limitantes para la salud, la productividad y el bienestar de rumiantes. La mortalidad por parásitos es la forma más extrema de reducir la productividad. Sin embargo, las pérdidas clínicas y subclínicas generadas por una reducción en la producción de lana, carne y leche de los animales afectados, como así también la afección directa o indirecta de las crías, son de fundamental importancia en los sistemas pastoriles; sin dejar de tener en cuenta la reducción en el nivel de bienestar de los animales (Nari y Fiel 2013). Las parasitosis gastrointestinales son producidas principalmente por nematodos gastrointestinales, siendo las especies de mayor importancia epidemiológica en el ganado ovino y caprino las pertenecientes al orden Strongylida. Estas especies se clasifican en cuatro superfamilias, de las cuales Trichostrongyloidea es la de mayor interés veterinario (Suárez, 2007).

Los efectos de las parasitosis en la producción ovina varían de acuerdo con la patogenicidad de la especie de parásito considerada, la carga parasitaria, la categoría del hospedador y su estado fisiológico y nutricional. Los principales signos de parasitismo están asociados a la presencia de anemia y muerte (*Haemonchus* spp.) o diarrea y retardo en el crecimiento (*Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp.).

La enfermedad parasitaria además se manifiesta con alteraciones de la ingesta, en la digestión y absorción de nutrientes y en la deposición de proteína, grasa y minerales, lo que termina afectando a los parámetros reproductivos e inmunitarios (Giudici *et al.* 2013).

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

Los parásitos abomasales, *Ostertagia* spp, *T. circumcincta* y *T. axei* producen lesiones que alteran la funcionalidad de las glándulas. Esto disminuye la producción de ácido clorhídrico, elevando el pH gástrico e impidiendo la activación del pepsinógeno, con la consiguiente falta de digestión proteica. En el caso de *H. contortus*, dado su

hábito hematófago, realiza movimientos que generan cortes en la mucosa, secretando al mismo tiempo sustancias anticoagulantes en la micro-herida. Generalmente los adultos no penetran en la mucosa, excepto el cuarto estadio, que cava en la mucosa del abomaso formando botones de sangre, debajo de los cuales come y permanece.

Dentro de los parásitos intestinales, la especie más predominante es *T. colubriformis*, responsable de diarreas a fines de otoño e invierno. En la Tabla 1 se presentan las especies de nematodos gastrointestinales más importantes que afectan a los ovinos y su sitio de localización.

Tabla 1: Parásitos gastrointestinales que afectan a los ovinos, su sitio de localización y los principales signos clínicos asociados.

Localización	Especie	Principales signos clínicos
Abomaso	<i>Haemonchus contortus</i>	Anemia, edema, pérdida de peso, muerte.
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Pérdidas productivas, diarrea
	<i>Trichostrongylus axei</i>	Pérdidas productivas, diarrea
Intestino delgado	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Pérdidas productivas, diarrea
	<i>Cooperia punctata</i>	Pérdida de peso, anorexia
	<i>Nematodirus fillicolis</i> y <i>SPATHIGER</i>	Pérdida de peso, anorexia
	<i>Strongyloides papillosus</i>	Pérdida de peso leve
Intestino grueso	<i>Trichuris ovis</i>	Diarrea leve
	<i>Chabertia ovina</i>	Anemia, pérdidas productivas

1. 2 Ciclo biológico

El ciclo biológico de los nematodos Trichostrongylidos es directo y se caracteriza por cuatro mudas y cinco estados entre larva y adulto, tal como se muestra en la Figura 1. Los animales parasitados eliminan los huevos en sus heces y una vez en el exterior, bajo condiciones apropiadas de temperatura, humedad y aireación, comienzan a desarrollarse las larvas del primer estadio (L1). La L1 eclosiona en la materia fecal y después de un período de actividad en el que se alimenta de bacterias y de hongos presentes en las heces, muda pasando a larva 2 (L2). Esta última tiene los mismos hábitos alimenticios que la L1, ambas almacenan reservas en sus células intestinales,

tienen escasa movilidad y son los estadios más vulnerables a las condiciones ambientales.

Luego de un período de reposo desarrolla la larva 3 (L3), la cual mantiene la cutícula de la L2 y desarrolla una nueva envoltura que le impide alimentarse, pero la hace resistente a las condiciones ambientales. La supervivencia de la L3 (larva infestante) depende de la energía acumulada en sus células intestinales. Éstas poseen una gran movilidad, abandonan las heces y migran por la pastura, permaneciendo allí hasta ser ingeridas por el hospedador (Soulsby, 1988; Entrocasso, 1988^a; Fiel y Steffan, 1994).

Luego de ser ingeridas, las L3 se liberan de la cutícula externa en una porción anterior a su sitio de localización (rumen en caso de parásitos abomasales y abomaso, en caso de parásitos intestinales) a partir de lo cual penetran en la mucosa (fase histotrófica). Allí sufren la segunda muda y evolucionan a larvas de 4° estadio (L4). Luego de unos días de crecimiento en la mucosa, emergen a la luz del abomaso o intestino a medida que se desarrollan a formas juveniles. Éstas maduran originando parásitos adultos en condiciones de copular y de producir huevos fértiles que son eliminados con las heces.

El tiempo transcurrido desde la infestación hasta la eliminación de huevos se denomina período de prepatencia y en general para los Tricoststrongylidos tiene una duración de 19 a 25 días (Soulsby, 1988; Fiel y Steffan, 1994). Este período de prepatencia puede demorarse bajo ciertas condiciones, las larvas pueden frenar su desarrollo en la mucosa y permanecer en un estado de reposo o inhibición durante 3 a 5 meses antes de retomar su desarrollo normal. Este fenómeno se denomina hipobiosis (Nari *et al.* 1982).

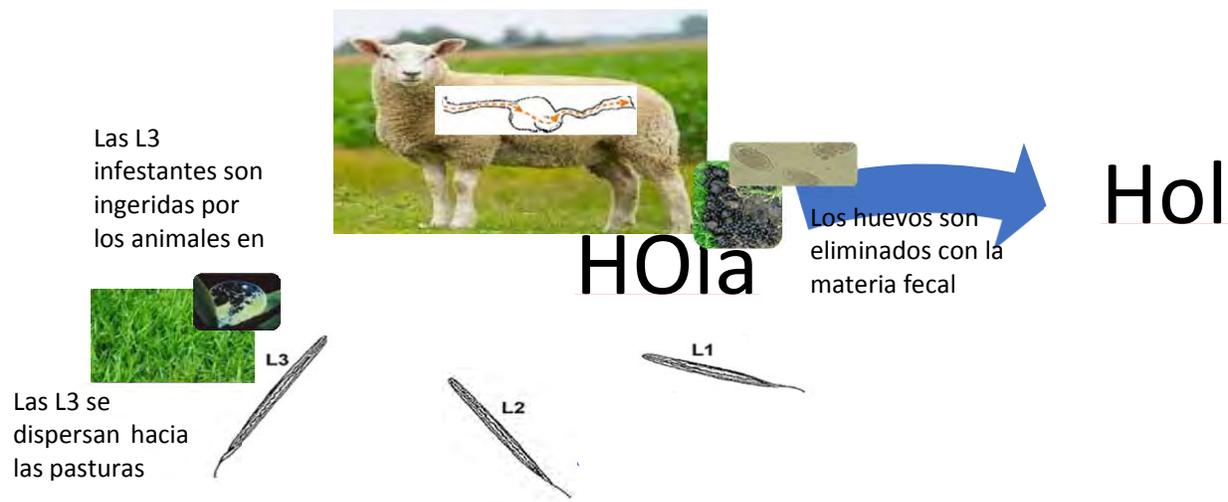


Figura 1: Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales.

1. 3 Patrones epidemiológicos en el sudeste bonaerense

Los géneros de parásitos que afectan a los ovinos muestran una marcada estacionalidad en la provincia de Buenos Aires. La oferta de L3 es principalmente de *Haemonchus* durante el verano y el otoño, mientras que la carga se diversifica a fines de invierno con L3 de *Trichostrongylus* spp, *Ostertagia* spp, *T. circumcincta* y *Cooperia* sp.

En los cuadros producidos por *H. contortus*, la contaminación de la pastura es rápida debido al gran potencial biótico del género que, ante condiciones climáticas de elevadas temperaturas y humedad (lluvias), produce un acelerado incremento de la infestividad de la pastura ocasionando un cuadro caracterizado por anemia aguda el cual puede ser rápidamente mortal.

Por su parte, el cuadro invernal está dominado por el parásito intestinal *T. colubriformis*, que presenta menor contaminación relativa (por su menor oviposición) y una mayor sintomatología expresada por diarreas de tipo crónico.

En lo que se refiere a otros géneros de parásitos como *Teladorsagia* y *Nematodirus*, se los halla en menor proporción que los anteriores, destacándose la participación del género *Cooperia* en sistemas mixtos (ovinos-bovinos).

1. 4 Control de las parasitosis gastrointestinales

En la actualidad existen diferentes medidas de control dirigidas a contrarrestar el efecto nocivo de las parasitosis, dentro de las alternativas de control no químico pueden citarse el manejo del pastoreo (Barger, 1999), la selección de animales resistentes (Eady *et al.* 1996), la inmunización activa mediante vacunas (Newton y Munn, 1999), el control biológico a través de enemigos naturales (*Duddingtonia flagrans*) (Paraud *et al.* 2006), el uso de determinadas pasturas (*Lotus* sp., *Trifolium vesiculosum* y *Desmodium* sp.) y manejo de la nutrición (proteínas, taninos) (Kyriazakis y Houdijk, 2006). Sin embargo, más allá del éxito que estas medidas puedan aportar a los sistemas productivos, el uso de fármacos antihelmínticos continúa siendo una herramienta clave en el control parasitario, siendo en muchos casos la única alternativa utilizada.

Un programa de control parasitario eficaz consiste en la planificación de acciones que incluyen diversas estrategias de manejo de los animales y las pasturas, junto con la administración de antihelmínticos, luego del diagnóstico parasitológico y terapéutico adecuado para cada unidad productiva. En este sentido, el avance y consolidación de

la resistencia a los antihelmínticos ha introducido una variable muy importante que limita el control de la enfermedad.

1. 4. 1 Control farmacológico

Para el control farmacológico de las parasitosis ovinas se dispone actualmente de 5 grupos químicos registrados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) como nematodocidas de amplio espectro, clasificados según sus propiedades farmacológicas en: Benzimidazoles (BZD) (albendazol, fenbendazol [FBZ], oxfendazol [OXF], etc), Imidazotiazoles (levamisol) [LEV], Lactonas Macrocíclicas (LM) con las avermectinas (ivermectina [IVM], abamectina [ABM], doramectina y eprinomectina) y las milbemicinas (moxidectin). Por otro lado, también están las salicilanilidas de espectro reducido, cuyo principal representante es el closantel y finalmente, como antihelmínticos de reciente desarrollo e incorporación al mercado veterinario se encuentran el monepantel, un derivado del animoacetonitrilo (Kaminsky *et al.* 2008) y el derquantel, del grupo de los spiroindoles (Little *et al.* 2011).

1. 5 Resistencia antihelmíntica

El uso de fármacos es la principal herramienta de control de las parasitosis, lo que muchas veces implica realizar sucesivos tratamientos en cortos periodos de tiempo. El uso indiscriminado de fármacos y su empleo sin base técnica, determinó una importante presión de selección sobre las poblaciones parasitarias, lo cual deriva en la selección de sub-poblaciones de parásitos resistentes (Wolstenholme *et al.* 2004).

El desarrollo de resistencia ocurrió relativamente rápido para todas las familias de fármacos antihelmínticos. Las estrategias de control supresivas efectuadas a toda la majada, utilizando antihelmínticos a intervalos regulares fueron factores determinantes en el desarrollo de la misma (Prichard, 2001).

La resistencia antihelmíntica puede ser definida entonces 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).

1. 5. 1 Antecedentes de resistencia antihelmíntica

El desarrollo de resistencia a los antihelmínticos disponibles constituye un serio problema para el control de las parasitosis gastrointestinales de ovinos, caprinos y bovinos a nivel mundial (Kaplan, 2004; Wolstenholme *et al.* 2004; Jabbar *et al.* 2006; Laing *et al.* 2017).

En Argentina, la prevalencia de resistencia es particularmente alta en nematodos de pequeños rumiantes, pero también se está incrementando seriamente en bovinos y equinos (Anziani, 2013). Los primeros reportes de resistencia fueron realizados por Entrocasso (1988^b) y Romero *et al.* (1992) para el grupo de los BZD y las especies de nematodos involucradas eran *H. contortus* y *N. spathiger*.

En el año 1996, en un estudio realizado en 73 establecimientos agropecuarios por Eddi *et al.* en las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos, se determinó que la prevalencia de resistencia de nematodos ovinos fue del 40% para BZD, 22% para LEV, 11% para la combinación BZD y LEV y del 6% para IVM. En el año 2005, en un relevamiento a nivel nacional Caracostantogolo *et al.* indicaron que más del 60% de las majadas presentaban poblaciones de nematodos con resistencia hacia alguno de los antihelmínticos disponibles. El mayor problema se observó en el NEA y especialmente en la provincia de Corrientes, en la cual la RA se incrementó dramáticamente desde los primeros estudios realizados por Romero *et al.* (1992) hasta el citado estudio nacional del 2005, en el cual todos los establecimientos estudiados en esta provincia (n=9) presentaban nematodos resistentes a IVM y a BZD en tanto que el 55% poseía, además, resistencia a LEV y a closantel.

Actualmente, es de particular preocupación el aumento y dispersión de aislamientos con resistencia a varios antihelmínticos. Aislamientos de *H. contortus* con resistencia múltiple a dos, tres y cuatro fármacos de diferente mecanismo de acción han sido informados en ovinos no solo en el NEA (Romero *et al.* 2007), sino también en provincias del área central como Buenos Aires (Entrocasso *et al.* 2008; Steffan *et al.* 2011) y Santa Fe (Anziani y Muchiut, 2014).

A finales de 2018 fue reportado por Illanes *et al.* el primer caso de resistencia a monepantel en la provincia de Corrientes, ocurrido luego de 6 tratamientos a lo largo del año 2014, realizados como paso previo a la introducción de una cepa susceptible. Los resultados obtenidos del Test de eficacia controlada expresaron una eficacia total del 70,8%, con valores de 11,3% para *H. contortus* y 28,6% para *Trichostrongylus colubriformis*.

1. 5. 2 Diagnóstico de resistencia antihelmíntica

1. 5. 2. 1 Pruebas *in vivo*

El método más usado para detectar y monitorear la presencia de resistencia antihelmíntica es el test de reducción en el conteo de huevos (TRCH) que es aplicable a todos los principios activos (Taylor *et al.* 2002) y que además es simple y relativamente fácil de realizar. La técnica se basa en el cálculo del porcentaje de reducción de huevos por gramo de materia fecal (hpg) antes y después del tratamiento antiparasitario.

En el caso de los ovinos, la Asociación Mundial de Parasitología Veterinaria (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP) establece que existe resistencia antihelmíntica cuando la reducción del conteo de hpg es menor al 95% y el límite inferior del intervalo de confianza del 95% es menor a 90%. Si solo una de estas dos condiciones está presente se sospecha la presencia de resistencia (Coles *et al.*, 1992).

En forma complementaria, esta prueba requiere el cultivo de muestras de material fecal (coprocultivo) para la identificación de los géneros parasitarios presentes antes y después del tratamiento, con el objetivo de determinar su participación relativa (McKenna, 1996).

Otra técnica de diagnóstico *in vivo* es el test de eficacia controlada (TEC), que se basa en la obtención de un porcentaje de eficacia mediante la comparación de poblaciones parasitarias a la necropsia de animales tratados y animales no tratados con fármacos antihelmínticos, recuperando, identificando y contando los parásitos presentes (Wood, *et al.* 1995). Este test representa el método más confiable en la evaluación de la actividad antihelmíntica ya que permite establecer con mayor precisión los alcances del problema y las especies parasitarias involucradas. Sin embargo, es una técnica laboriosa y de alto costo dado que implica el sacrificio de animales. Por este motivo no suele ser utilizado en el diagnóstico de rutina (Anziani y Fiel, 2005).

1. 5. 2. 2 Pruebas *in vitro*

Las pruebas de diagnóstico *in vitro* para el estudio de resistencia implican el cultivo de huevos y/o la incubación de larvas de nematodos gastrointestinales, las cuales se exponen a concentraciones diferentes de los fármacos a evaluar. Dichas pruebas evalúan el efecto de los fármacos en diferentes aspectos del desarrollo parasitario:

eclosión de huevos, desarrollo y/o motilidad de las larvas. Tales técnicas presentan como ventaja menores costos para su ejecución, lo cual es importante especialmente si se desea probar gran cantidad de principios activos (Sangster y Gill, 1999).

Sin embargo, una posible desventaja es que no reflejan la relación farmacocinética-farmacodinamia del fármaco en el sistema hospedador-parásito, por lo que es necesario que sean validadas con información *in vivo* (Sangster y Gill, 1999). Además, requieren del mantenimiento de aislamientos parasitarios monoespecíficos de referencia para lograr repetibilidad de resultados entre laboratorios. Los métodos *in vitro* más utilizados en la actualidad son el test de eclosión de huevos (TEH) y el test de desarrollo larval (TDL), el test de inhibición de la migración larval (TIML) y el test de inhibición de la alimentación larval (TIAL).

El TEH es recomendado por la WAAVP para detectar resistencia a los BZD dado que este grupo de fármacos presenta efecto ovicida en poblaciones parasitarias susceptibles. La prueba original fue descrita por Le Jambre (1976) y aún continúa utilizándose con modificaciones menores según el autor (Taylor *et al.*, 2002). La misma consiste en la incubación de huevos de nematodos frescos (no embrionados) en un rango de concentraciones de tiabendazole (TBZ), a partir de allí se calcula el porcentaje de huevos eclosionados (Coles *et al.*, 2006).

El TDL puede ser utilizado para diagnosticar resistencia a cualquier grupo de antihelmínticos (Coles, 2005; Dolinská, 2013) y consiste en evaluar el desarrollo de L1 a L3 en presencia de concentraciones crecientes del principio activo, en un medio enriquecido con *Escherichia coli* y extracto de levadura como fuente de alimento. Luego del período de incubación (generalmente 7 días) se calcula el porcentaje de inhibición del desarrollo de las larvas. Esta prueba además permite la diferenciación de especies al identificar las L3 (Coles, 2005).

El TIML se utiliza para la detección de resistencia a LEV y LM. Esta prueba consiste en enfrentar L3 a diferentes concentraciones de fármaco y luego evaluar su motilidad mediante el pasaje por una malla que permite solamente el pasaje de larvas vivas y activas. Contando las larvas migradas y las no migradas se puede calcular el porcentaje de inhibición de la motilidad (Demeler *et al.*, 2010^a).

El TIAL se aplica a LEV y LM. La técnica consiste en exponer L1 a diferentes concentraciones de antihelmíntico, con el agregado de un medio nutritivo a base de *E. coli* marcada con un compuesto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína). Luego de la incubación se calcula el porcentaje de inhibición de la alimentación contando la cantidad de larvas fluorescentes (Álvarez Sánchez *et al.*, 2005).

1. 5. 2. 3 Pruebas de Biología Molecular

La resistencia antihelmíntica tiene una base genética, y puede ser detectada mediante cambios en las secuencias de ADN, ya sean cualitativos (mutaciones) o cuantitativos (alteración en la expresión de genes).

El avance de la biología molecular ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia a drogas. La modificación del canal de cloro ligado al glutamato (Njue *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2021) y la sobreexpresión del gen que codifica para la proteína de eflujo Gp-P (Blackhall *et al.*, 1998), han sido descritos, entre otros, como potenciales mecanismos de resistencia a las LM. Mientras que, para el LEV, cuyo mecanismo de acción es ser agonista de los receptores nicotínicos (Martin, 1997), se han descrito cambios en las subunidades proteicas que conforman estos receptores involucrados en la resistencia a este fármaco, aunque los mecanismos exactos de resistencia aún no han sido dilucidados (Sarai *et al.*, 2014; Barrere *et al.*, 2014).

Al igual que para las LM, la interacción de LEV con la Gp-P fue evidenciada por Kerboeuf y Guégnard (2011). Esta interacción fue luego confirmada por Raza *et al.* (2016^b) quienes demostraron incrementos de la expresión de Gp-P luego de 3 h de exposición a LEV en un aislamiento de *H. contortus* resistente.

El desarrollo de pruebas moleculares de elevada sensibilidad permitió detectar la resistencia a BZD en niveles muy bajos comparado con los métodos *in vivo* e *in vitro* (von Samson-Himmelsjerna, 2006). A pesar de los trabajos realizados en todo el mundo y a excepción del grupo de los BZD, aún no se han descrito técnicas moleculares específicas para el diagnóstico de resistencia a otros grupos químicos.

Los fenómenos de resistencia antihelmíntica involucran no solo cambios en los receptores específicos que disminuyen la afinidad de los fármacos, sino también cambios en la expresión de ciertos genes. Por ejemplo, incrementos en la frecuencia de expresión de los genes que codifican para la proteína de eflujo Glicoproteína-P (Gp-P) determinan una menor acumulación del fármaco en su sitio de acción (Lespine *et al.*, 2012). Cuando se usan las pruebas moleculares, al igual que las pruebas *in vivo* e *in vitro*, el desafío consiste en la correcta identificación de la resistencia en infestaciones parasitarias mixtas. Puede ocurrir que los parásitos no presenten mutaciones específicas asociadas a resistencia. Sin embargo, pueden sobre-expresar ciertos genes y evidenciar cambios que les permitan tolerar concentraciones de antihelmínticos que de otra forma serían incompatibles con su supervivencia (Coles, 2005). Esto representa un problema a la hora de determinar, por técnicas moleculares,

la susceptibilidad/resistencia de las poblaciones parasitarias a determinados grupos de fármacos.

1. 6 Estrategias farmacológicas para optimizar la eficacia antihelmíntica

Ante el avance del fenómeno de resistencia antihelmíntica, se han propuesto diferentes estrategias de base farmacológica con el objetivo de retardar y/o controlar el desarrollo de la misma (Geary *et al.*, 2012; Lanusse *et al.*, 2014). Una de ellas es el uso combinado de fármacos antihelmínticos con diferente mecanismo de acción. El uso combinado de fármacos puede contribuir a mejorar la eficacia contra poblaciones de parásitos resistentes (Anderson *et al.*, 1988; Bartram *et al.*, 2012; Geary *et al.*, 2012), en especial si los fármacos de la combinación tienen una elevada eficacia contra la población tratada (Bartram *et al.*, 2012). Si se logra eliminar la totalidad de los parásitos con un tratamiento antihelmíntico, existe menor presión de selección y se retrasa la aparición de resistencia a causa de los tratamientos. Sin embargo, cuando existe un alto nivel de resistencia a los fármacos incluidos en la combinación, su uso está bajo discusión (Suarez *et al.*, 2014; Lanusse *et al.*, 2014).

Un aspecto importante a tener en cuenta es la necesidad de conocer las potenciales interacciones farmacocinéticas-farmacodinámicas entre los fármacos empleados en una combinación, antes de su introducción al mercado farmacéutico veterinario (Alvarez *et al.*, 2008). Para evaluar las posibles interacciones farmacodinámicas que pueden existir al administrar diferentes fármacos en forma simultánea, 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 cepas resistentes, porque podría ocurrir que dos fármacos 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).

Con respecto a las interacciones farmacocinéticas, las mismas ocurren cuando un fármaco modifica la absorción, distribución, biotransformación y/o eliminación de otro.

En algunos casos, si las concentraciones de los fármacos combinados se modifican ampliamente, se puede obtener una alteración en su eficacia y en el margen de seguridad de los mismos. 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).

Es importante destacar que las interacciones pueden darse a nivel del animal tratado, pero también a nivel del parásito, de tal forma que puede verse modificada sustancialmente la acumulación de fármaco en el parásito y/o el efecto final observado sobre el mismo. Por tal razón, antes que una herramienta de este tipo pueda ser recomendada para su uso práctico, es necesario evaluar su utilidad real, el impacto de las potenciales interacciones cinéticas y dinámicas, y la capacidad del tratamiento antihelmíntico de mantener adecuados niveles de eficacia a través del tiempo.

1. 7 Marco teórico, hipótesis y objetivo general

Para optimizar la eficiencia del control antiparasitario es fundamental conocer las propiedades físico-químicas, el comportamiento farmacológico y la eficacia clínica de los antihelmínticos, así como también su relación con la información epidemiológica disponible.

En la presente Tesis se estudió la relación farmacocinética-farmacodinamia de dos antihelmínticos utilizados en forma combinada sobre una población de nematodos gastrointestinales resistentes. Se estudió además la evolución de la eficacia nematodocida de la combinación tras cuatro años de uso.

1. 7.1 Objetivo general

Evaluar las potenciales interacciones farmacocinéticas y la evolución de la eficacia de la combinación moxidectina (MOX) y levamisol (LEV) en el control de nematodos gastrointestinales resistentes de ovinos.

1. 7.2 Hipótesis del trabajo

La administración combinada de MOX y LEV resulta en una interacción farmacológica sustentable para el control de nematodos gastrointestinales resistentes de ovinos.

1. 7. 3 Desarrollo y organización del trabajo experimental

La fase animal del presente trabajo se desarrolló en la Reserva 8 de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce (Lat -37° 45' S – Long -58° 18' O de Greenwich – 130 msnm). Dicha reserva está destinada a la cría y experimentación animal en la especie ovina.

Los análisis parasitológicos fueron desarrollados en el Laboratorio de Parasitología perteneciente al Grupo de Sanidad Animal del INTA Balcarce, y los análisis farmacológicos y moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Farmacología, CIVETAN (UNCPBA-CICPBA-CONICET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

La sección experimental de esta tesis se presenta organizada en capítulos. El Capítulo II describe los ensayos *in vivo* realizados para evaluar el efecto de la administración conjunta de MOX y LEV. En el Capítulo III se describe la metodología *in vitro* utilizada para evaluar la susceptibilidad del aislamiento de *H. contortus* frente a MOX y LEV. Finalmente, en el Capítulo IV, se incluye la discusión general y las principales conclusiones del trabajo.

CAPÍTULO II

“Caracterización fármaco-parasitológica del tratamiento combinado de MOX y LEV en ovinos parasitados naturalmente con nematodos gastrointestinales resistentes (estudios *in vivo*)”

2. Introducción

El avance de la resistencia antihelmíntica es un problema de gran relevancia que dificulta el control de los nematodos gastrointestinales en la producción de bovinos, ovinos y caprinos a nivel mundial (Kaplan, 2004; Wolstenholme *et al.*, 2004; Jabbar *et al.*, 2006; Laing *et al.*, 2017). Ante las dificultades que presenta el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antihelmíntica, resulta prioritario optimizar el uso de los fármacos disponibles.

En este sentido y con el objetivo de evitar o retardar el desarrollo de resistencia se han propuesto combinaciones de dos o más fármacos antihelmínticos en varias regiones del mundo (Anderson *et al.*, 1988; Geary *et al.*, 2012). En una situación ideal, el uso de combinaciones puede ser una estrategia válida si cada molécula incluida presenta eficacia individual cercana al 100% (Bartram *et al.*, 2012). En nuestro país la falla terapéutica de los BZD y las avermectinas ha sido reportada en varios estudios (Caracostantogolo *et al.*; 2005; Cristel *et al.*, 2017). Sin embargo, moxidectina (MOX) y levamisol (LEV) son moléculas que aún mantienen niveles aceptables de eficacia antihelmíntica (Cristel *et al.*, 2017).

Mientras que la combinación de ivermectina (IVM) y LEV fue recientemente aprobada para su venta en el mercado farmacéutico veterinario de nuestro país para su uso en bovinos, las combinaciones de dos o más productos son ampliamente usadas en Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica y en otros países de América del Sur, como Uruguay. En este sentido, la combinación de una molécula de rápida actividad como el LEV con una LM de diferente familia a la IVM como el MOX aún no ha sido evaluada. La caracterización de potenciales interacciones farmacocinéticas entre MOX y LEV y la respuesta terapéutica de su co-administración a largo plazo aporta información de gran utilidad para el sector agropecuario.

Los estudios *in vivo* que forman parte de esta Tesis fueron desarrollados por un período de 4 años en la Reserva Experimental 8, EEA-INTA Balcarce, (Balcarce, Argentina). Dicha reserva está destinada a la cría de ovinos y cuenta con instalaciones apropiadas para el manejo de los animales. Se trabajó con corderos cruce Texel/Corriedale/Poll Dorset/Highlander de 6 meses de edad y clínicamente sanos, seleccionados por similares características de peso y estado corporal. Los animales fueron mantenidos en un potrero de 12 ha., infestado naturalmente con larvas de

nematodos gastrointestinales resistentes a IVM (Entrocasso *et al.* 2008; Lifschitz *et al.*, 2010; Lloberas *et al.*, 2012; 2013; 2015) y BZD albendazol/fenbendazol (Entrocasso *et al.*, 2008; Muchiut *et al.*, 2019; Luque, 2019; Miró *et al.*, 2020). En el potrero los animales disponían de una pastura compuesta por festuca, agropiro y trébol rojo, y libre acceso al agua.

Todos los procedimientos experimentales que involucraron el trabajo con animales se realizaron siguiendo normas internacionalmente aceptadas de bienestar animal y estuvieron aprobados por el comité de bienestar animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA, Tandil y por el CICUAE del INTA Balcarce (2015/005).

La fase experimental de este capítulo se presenta organizada en dos secciones experimentales, en la primera de ellas se realizó la caracterización farmacocinética de la co-administración de MOX y LEV en ovinos naturalmente parasitados, mientras que en la segunda se presenta la caracterización parasitológica en respuesta al tratamiento combinado por el transcurso de 4 años.

2. 1 Sección Experimental 1

“Caracterización del comportamiento farmacológico de MOX y LEV administrados conjuntamente en ovinos parasitados naturalmente con nematodos gastrointestinales”

2. 1. 1 Objetivos específicos

- Estudiar la cinética plasmática de MOX y LEV utilizados en forma individual o combinada, en ovinos naturalmente infestados con nematodos gastrointestinales.
- Evaluar potenciales interacciones farmacocinéticas entre MOX y LEV utilizados en forma individual o combinada, en ovinos naturalmente infestados con nematodos gastrointestinales.

2. 1. 2 Grupos experimentales y tratamientos

Se utilizaron 18 corderos de la majada de cruzamiento (Texel, Corriedale, Poll Dorset y Highlander), los mismos fueron asignados a los diferentes grupos experimentales (n=6) de manera homogénea en base a sus valores de peso y hpg (huevos por gramo de materia fecal) individual. Se realizaron los siguientes tratamientos:

Grupo MOX, tratado con MOX (Cydectin α 1%, Zoetis®) a la dosis terapéutica (0,2 mg/kg);

Grupo LEV, tratado con fosfato de LEV (Fosfamisol MV 22,3%, Biogénesis Bagó®) a la dosis terapéutica (8 mg/kg);

Grupo MOX+LEV, tratado con MOX y LEV en forma simultánea, a las dosis terapéuticas (0,2 y 8 mg/kg, respectivamente);

Los tratamientos fueron realizados por la vía SC en la cara interna del muslo, con la salvedad que para la co-administración se realizó una inyección en cada muslo del animal.

Se tomaron muestras de sangre (3 ml) por punción yugular en tubos Vacutainer® heparinizados (Becton Dickinson, NJ, USA). Las muestras fueron tomadas en forma previa al tratamiento (tiempo 0) y a diferentes tiempos post-administración (2, 4, 8, 12, 24 y 30 h, 2, 3, 5, 8, 12, 14 días en el caso de MOX y 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 24 h en el caso de LEV). Las muestras fueron centrifugadas a 2000 x g por 15 minutos y el plasma obtenido fue identificado y almacenado a -20 °C hasta el momento de su análisis.

2. 1. 3 Preparación de estándares

Los estándares de los analitos utilizados fueron preparados utilizando principios activos de máxima pureza (>99% pureza) (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, USA) y solubilizados en metanol para obtener soluciones madre de 1000 ng/ml (abamectina [ABM], MOX) y 1000 μ g/ml (LEV). A partir de las mismas se realizaron sucesivas diluciones en metanol hasta obtener las diferentes concentraciones de trabajo, ya sea para su inyección directa o para adicionar al plasma obtenido de ovinos sin tratamiento previo. Las soluciones obtenidas fueron almacenadas a 4°C y protegidas de la luz.

Los solventes (acetonitrilo y metanol) usados durante la extracción y el análisis de los analitos fueron de grado HPLC y provistos por Sintorgan® (Buenos Aires, Argentina). El agua utilizada fue destilada y posteriormente desionizada utilizando un sistema de purificación de agua (Simplicity®, Millipore, Brasil).

2. 1. 4 Extracción físico-química de moxidectina y análisis cromatográfico

El plasma obtenido de los animales de los grupos tratados con MOX fue sometido a un proceso de extracción y posterior derivatización para luego ser analizado por la técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detector de

fluorescencia, de acuerdo al procedimiento descrito por Lifschitz *et al.* (1999^a) y Lloberas *et al.* (2015).

Se trabajó con 1 ml de plasma, al cual se le adicionaron 10 µl de una solución de abamectina (ABM, 10 ng/ml) como estándar interno y luego 1 ml de acetonitrilo: agua (4:1). La mezcla obtenida fue agitada durante 15 minutos y luego centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos.

El sobrenadante fue inyectado manualmente en cartuchos de C18 (RP-18 100 mg, Strata®, Phenomex, CA, EEUU), previamente acondicionados con 1ml de metanol y 1 ml de agua. Luego de lavar los cartuchos con 1ml de agua seguido de 1ml de agua: metanol (4:1). Posteriormente MOX se eluyó con 1,5 ml de metanol, que luego se evaporó a sequedad en atmósfera de nitrógeno a 45 °C.

La derivatización de MOX fue llevada a cabo con 100 µl de una solución de N-methylimidazol (Sigma Chemical, USA) en acetonitrilo (1:1) y 150 µL de una solución de ácido trifluoro-acético anhidro (Sigma Chemical, USA) en acetonitrilo (1:2) (De Montigny *et al.*, 1990). Luego de completada la reacción (<30 segundos), se inyectó una alícuota (100 µl) de la solución directamente en el sistema cromatográfico HPLC.

Las concentraciones plasmáticas de MOX fueron medidas por HPLC utilizando un cromatógrafo Shimadzu-10 A HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Se utilizó una columna cromatográfica de C18 (Kromasil, Eka Chemicals, Bohus, Suecia, 5 µm, 4.6 mm x 250 mm) mantenida en un horno a 30 °C (Eppendorf TC-45, Eppendorf, Madison, EEUU). La fase móvil consistió en una mezcla de ácido acético (0,2%) en agua, metanol y acetonitrilo (1,6%/60%/38,4%) con un flujo de 1,5 ml/min. La detección se realizó mediante un detector de fluorescencia (RF-10), leyendo a una excitación de 365 nm y una emisión de 475 nm (Lifschitz *et al.*, 1999^a y 2000). El tiempo de retención fue de 14 min, dato obtenido en base a la comparación con el estándar puro.

Los datos obtenidos fueron analizados por medio del software LC Solutions® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

2. 1. 5 Extracción físico-química de levamisol y análisis cromatográfico

Para la cuantificación de las concentraciones de LEV en el plasma obtenido de los animales que recibieron tratamiento, se utilizaron los procedimientos descritos por Suarez *et al.* (2014) adaptados a las condiciones de trabajo de esta Tesis.

Se trabajó con 1 ml de plasma que fue inyectado en cartuchos de C18 (RP-18 100 mg, Strata®, Phenomex, CA, EEUU), previamente acondicionados con 1ml de metanol y 1 ml de agua. Luego de lavar los cartuchos con 1ml de agua seguido de 1ml de

agua: metanol (4:1). Para la elución de LEV se utilizó 1,5 ml de metanol y luego se realizó la evaporación a sequedad en atmósfera de nitrógeno a 56 °C. El residuo seco fue reconstituido con 250 µL de fase móvil y se utilizó una alícuota de 100 µL para su inyección directa en el sistema HPLC.

Las concentraciones plasmáticas de LEV fueron medidas por HPLC utilizando un cromatógrafo Shimadzu-10 A HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) con detector UV. Se utilizó una columna cromatográfica de C18 (Gemini, Phenomenex, USA, 5 µm, 4.6 mm x 250 mm), la fase móvil consistió en una mezcla de ácido fosfórico (85%) en trietilamina/metanol/acetonitrilo/agua (0,32%/0,5%/15,5%/83,68%) con un flujo de 1,2 ml/min. Los datos obtenidos fueron analizados por medio del software LC solutions® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

2. 1. 6 Validación de la metodología analítica

Las rectas de calibración se construyeron añadiendo concentraciones crecientes del fármaco, en un rango de 0,05 – 40 ng/ml para MOX y de 0,05 – 2 µg/ml para LEV, a muestras de plasma ovino sin tratamiento. Se utilizó un análisis de regresión lineal para cada una de las rectas de calibración para determinar las concentraciones del fármaco en las muestras provenientes de los animales tratados utilizando la ecuación de la recta: $y = ax + b$, donde

a: pendiente de la recta de calibración, b: intercepto, x: concentración observada, y: respuesta del detector expresada en área cromatográfica.

La validación de la metodología analítica se realizó de acuerdo a los parámetros internacionales aceptados para métodos cromatográficos (Shah *et al.*, 1992). Dicha validación incluyó la determinación de la especificidad, linealidad, porcentaje de recuperación, precisión analítica y límites de cuantificación y detección.

2. 1. 7 Análisis de los resultados farmacocinéticos

Las curvas concentración vs tiempo para MOX y LEV, se realizaron en base a los promedios de concentraciones obtenidas para cada analito. Los parámetros farmacocinéticos se determinaron siguiendo un análisis no-compartimental utilizando el programa PK solution 2.0 (Summit Research Services, USA).

Se calcularon los parámetros farmacocinéticos de mayor relevancia clínica de acuerdo a lo descrito por Gibaldi y Perrier (1982). La concentración máxima (C_{max}) y el tiempo en que ésta es obtenida (T_{max}), fueron leídos en las curvas concentración-tiempo de cada droga en cada animal individual. Se calculó la constante de

eliminación (γ_{el}) mediante un análisis de regresión utilizando al menos 4-5 puntos del gráfico concentración vs tiempo de la fase terminal. La vida media de eliminación ($T_{1/2}$ el), fue calculada de la siguiente manera: $\ln 2 / \gamma_{el}$. El área bajo la curva desde 0 a tiempo t (tiempo de la última concentración cuantificable) (ABC_{0-t}) fue calculada por medio del método de los trapezoides (Gibaldi and Perrier, 1982) y posteriormente extrapolada a infinito (ABC_{0-inf}) dividiendo la última concentración experimental por la constante de eliminación (γ_{el}).

Los promedios de los parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron comparados estadísticamente utilizando el programa Instat 3.0 (Graph Pad software Inc., San Diego, EEUU). Se utilizó el Test de Student para la comparación de los parámetros ABC_{0-t} y C_{max} obtenidos de los animales con administración individual o combinada de los fármacos en estudio. Para la comparación de los valores de T_{max} se utilizó el test de Mann-Whitney. En todos los casos, se consideró un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$)

2. 1. 8 Resultados

2. 1. 8. 1 Validación de métodos cromatográficos de MOX y LEV en plasma

La metodología analítica de extracción físico-química, derivatización (MOX) y análisis por HPLC se validó adecuadamente en la matriz de estudio (plasma ovino). Las curvas de calibración fueron construidas por el método de regresión lineal en el rango de concentraciones de 0,05 a 40 ng/ml para MOX y de 0,05 a 2 μ g/ml para LEV, en ambos casos evidenciaron coeficientes de determinación superiores a 0.98. Las Figuras 2 y 3 muestran las curvas de calibración en plasma ovino para MOX y LEV. En ambos casos, los porcentajes de recuperación promedio estuvieron por encima del 70% con un coeficiente de variación (CV) de 13,2% (MOX) y de 8,7% (LEV). El límite de cuantificación resultó de 0,2 ng/ml para MOX y 0,02 μ g/ml para LEV. La precisión analítica obtenida luego de la extracción y análisis por HPLC de estándares resultó en un coeficiente de variación menor a 10%, lo que indica reproducibilidad de los métodos empleados.

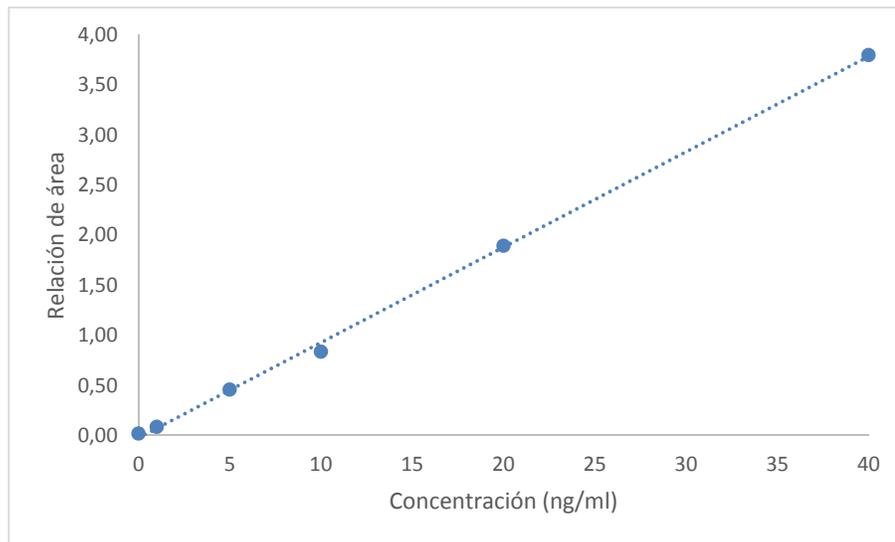


Figura 2: Curva de calibración obtenida para moxidectina (MOX) en plasma ovino.

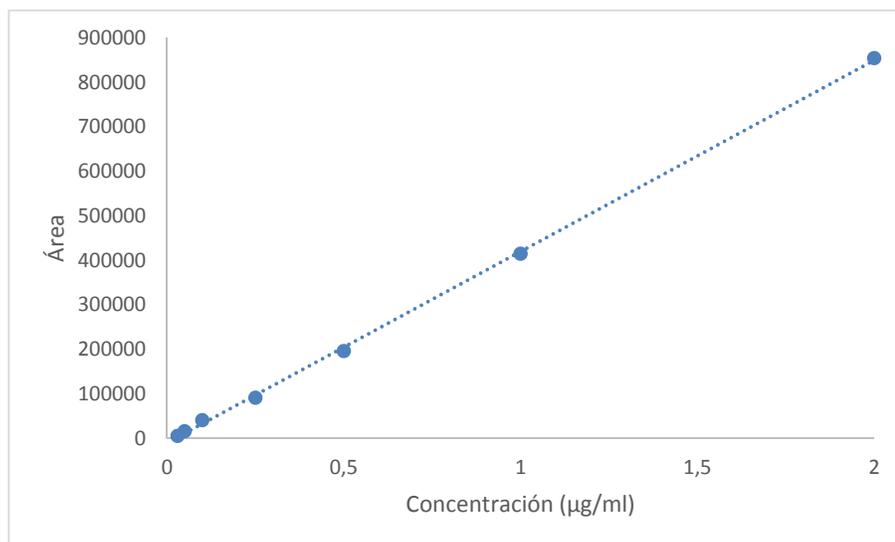


Figura 3: Curva de calibración obtenida para levamisol (LEV) en plasma ovino.

En la Tabla 2 se resumen los principales resultados obtenidos en la validación de la metodología para los analitos estudiados.

Tabla 2: Principales parámetros de validación analítica obtenidos para los diferentes analitos estudiados.

Parámetro	MOX	LEV
Linealidad (r^2)	> 0,98	> 0,98
Recuperación (%)	76,6	75,9
Repetibilidad (CV en %)	6,8	7,1
Límite de cuantificación (ng/ml)	0,2	20

r^2 : coeficiente de determinación. CV: coeficiente de variación

2. 1. 8. 2 Cinética plasmática de MOX y LEV

Ninguno de los animales involucrados presentó efectos adversos ocasionados por el uso de la combinación de fármacos. MOX y LEV fueron detectados en el plasma de los animales tratados, sin interferencias en los cromatogramas. Mientras que MOX fue detectada hasta los 14 días post tratamiento, LEV se detectó en plasma sólo hasta las 24 h en el caso del tratamiento individual y hasta las 16 h en el caso de su co-administración con MOX.

LEV presentó una rápida absorción con un valor de T_{max} de 1,46 h mientras que para MOX se obtuvo un T_{max} de 1,06 d. De manera similar la vida media de eliminación ($T_{1/2el}=3,2$ h) de LEV reflejó una rápida eliminación de este compuesto del organismo en relación con MOX cuya $T_{1/2el}$ fue de 5,5 d.

No se observaron cambios farmacocinéticos significativos para MOX o LEV luego de su administración conjunta. En las Figuras 4 y 5 se presentan los perfiles de concentraciones plasmáticas promedio de MOX y LEV, respectivamente, luego de su administración SC de manera individual o combinada en corderos naturalmente parasitados.

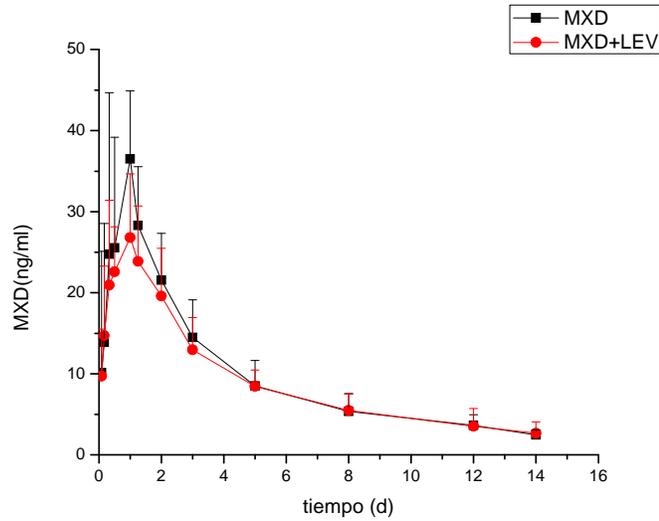


Figura 4: Perfil de concentraciones plasmáticas promedio (+DE) de moxidectina (MOX) luego de su administración SC (0,2 mg/kg), de manera individual o combinada con levamisol (LEV) (8 mg/kg).

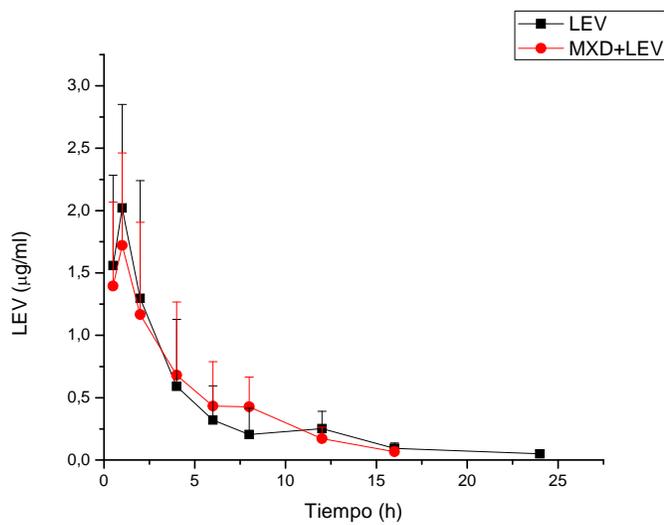


Figura 5: Perfil de concentraciones plasmáticas promedio (+DE) de levamisol (LEV) luego de su administración SC (8 mg/kg), de manera individual o combinada con moxidectina (MOX) (0,2 mg/kg).

En la Tabla 3 se resumen los principales parámetros farmacocinéticos (promedio \pm DE) para MOX y LEV, luego de su administración única o combinada.

Tabla 3: Principales parámetros farmacocinéticos (media \pm DE) obtenidos para moxidectina (MOX) y levamisol (LEV), luego de la administración SC de MOX (0,2 mg/kg) o LEV (8 mg/kg) de manera individual o combinada en corderos naturalmente infestados con nematodos gastrointestinales (n=6).

Parámetro	MOX		LEV	
	MOX	MOX+LEV	LEV	MOX+LEV
C_{max} (ng/ml; μ g/ml)	40.0 \pm 12.0	30.0 \pm 8.7	2.04 \pm 0.76	1.72 \pm 0.74
T_{max} (d; h)	1.06 \pm 0.53	0.86 \pm 0.42	1.46 \pm 1.08	1.17 \pm 0.41
ABC_{0-t} (ng- μ g.d-h/ml)	141 \pm 26.1	169 \pm 73.9	7.41 \pm 5.28	7.35 \pm 4.90
ABC_{0-inf} (ng- μ g.d-h/ml)	153 \pm 26.6	193 \pm 76.5	7.65 \pm 5.35	7.59 \pm 5.01
T_{1/2el} (d; h)	5.55 \pm 1.19	6.19 \pm 3.47	3.20 \pm 1.35	2.52 \pm 0.93

C_{max}: Concentración plasmática máxima; T_{max}: Tiempo en que se obtiene C_{max}; ABC_{0-t}: Área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 a tiempo t; ABC_{0-inf}: Área bajo la curva de concentración vs tiempo extrapolada a infinito; T_{1/2el}: Vida media de eliminación. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$) para cada parámetro farmacocinético.

2. 1. 9 Principales aportes

Considerando que los resultados específicos de esta sección experimental se discuten en forma integral en la Discusión General (Capítulo IV) de la presente Tesis, y a los efectos de lograr una comprensión general de cada ensayo clínico, se resumen a continuación los principales aportes del mismo:

- No se observaron cambios significativos en la cinética de disposición de MOX y LEV luego de su co-administración en comparación con la administración individual.
- La falta de interacciones negativas permite que esta combinación pueda ser utilizada estratégicamente en diferentes situaciones epidemiológicas como herramienta de control parasitario.

2. 2 Sección Experimental 2

“Caracterización parasitológica y monitoreo de la eficacia de MOX y LEV administrados conjuntamente en ovinos parasitados naturalmente con nematodos gastrointestinales”

2. 2. 1 Objetivos específicos:

- Estudiar la evolución de la eficacia clínica de MOX y LEV durante 4 años, utilizados de manera individual o combinada en ovinos naturalmente infestados con nematodos gastrointestinales.
- Estudiar la eficacia inicial y final de la administración combinada de MOX y LEV, en ovinos naturalmente infestados con nematodos gastrointestinales.

2. 2. 2 Metodología experimental

Cada año de trabajo ingresaron al potrero experimental 40-50 corderos (6-7 meses de edad) provenientes de la majada de cruzamiento con el objetivo de mantener la población parasitaria pre-seleccionada y monitorear la eficacia clínica del tratamiento con MOX+LEV a lo largo del tiempo.

En el primer año, 2014, los animales fueron tratados con monepantel (MNP) por vía oral (5 mg/kg, Zolvix®, Novartis, Argentina) de manera previa a su ingreso al potrero. Los siguientes años el tratamiento inicial se realizó con la co-administración de MOX y LEV por vía SC a las dosis recomendadas (0,2 mg/kg y 8 mg/kg, respectivamente). Luego del tratamiento y antes de su introducción en la parcela, los animales permanecieron en un corral con piso de cemento por un periodo de 72 h, alimentados con fardos de alfalfa y agua *ad libitum*. Es importante mencionar que durante los 4 años de trabajo los únicos animales que pastorearon en el potrero experimental fueron los incluidos en los ensayos de la presente Tesis.

En el transcurso de cada ciclo productivo (año) se realizaron monitoreos mensuales para estimar la carga parasitaria mediante el conteo de huevos por gramo de materia fecal (hpg) mediante la técnica de Mc Master modificada (Roberts y O’Sullivan, 1950) y se realizó la caracterización de los géneros parasitarios mediante coprocultivos e identificación de L3 (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food [MAFF], 1986). Según este valor y siguiendo criterios epidemiológicos y sanitarios de la majada a lo largo del año, los animales fueron tratados con la administración combinada de MOX+LEV y se calculó el porcentaje de reducción de la cuenta de huevos (%RCH) para dicho

tratamiento según la fórmula: $\%RCH = 100 \times (1 - T2/T1)$ (McKenna *et al.*, 1990), donde T2 y T1 son la media aritmética del conteo de hpg luego del tratamiento combinado a los 14 días post administración y al día -1 (antes del tratamiento), respectivamente. Los intervalos de confianza del 95% fueron calculados según lo recomendado por Coles *et al.* (1992).

Para el cálculo de la eficacia antihelmíntica sobre cada género parasitario en particular se realizó la división entre la media del conteo de hpg al día -1 y al día 14 post tratamiento sobre la proporción de L3 de cada género en su respectivo coprocultivo. La Figura 6 muestra una representación esquemática de los tratamientos realizados a lo largo de todo el periodo experimental.

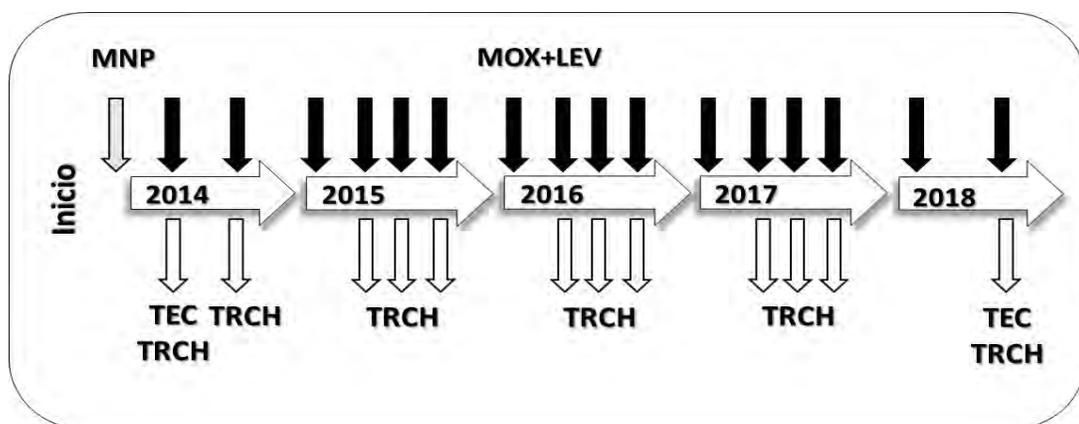


Figura 6: Representación esquemática de los tratamientos realizados a lo largo de todo el periodo experimental y sus respectivas determinaciones de eficacia. MNP: monepantel; TEC: Test de eficacia controlada; TRCH: Test de reducción de la cuenta de huevos en materia fecal.

Al inicio (julio 2014) y al final (julio 2018) de los estudios *in vivo*, se determinó la eficacia del tratamiento combinado con MOX+LEV por medio del Test de Eficacia Controlada (TEC) (Wood *et al.*, 1995). Para ello, se introdujeron 12 corderos adicionales al potrero experimental y cuando sus valores de hpg estuvieron por encima de 800, los mismos fueron adjudicados a los grupos experimentales 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 del tratamiento a cada grupo fue realizada mediante un diseño aleatorizado.

Un grupo recibió el tratamiento combinado de MOX (0.2 mg/kg, Cydectin Alfa® 1%, Zoetis, Argentina) y LEV (8 mg/kg, Fosfamisol MV® 22.3%, Biogénesis Bagó, Argentina) por vía SC y el otro grupo permaneció sin tratamiento como control. Durante los 15 días previos al sacrificio los animales estuvieron alojados en corrales con piso de cemento,

alimentados con fardos de alfalfa y con libre acceso al agua. El sacrificio fue realizado por noqueo mediante bala cautiva y posterior desangrado.

En la necropsia se procedió a la extracción individual de cada órgano (abomaso, intestino delgado e intestino grueso) previa ligadura en ambos extremos. Mediante sección longitudinal de los mismos se colectó su contenido al igual que el agua utilizada para el lavado de las mucosas en baldes plásticos identificados. El contenido de cada balde fue lavado y filtrado por una malla de 38 μ m, de este contenido y previa homogenización se extrajo una alícuota (10%) que luego fue transferida a placas de Petri de 15 cm de diámetro. Sobre luz invertida se procedió al conteo e identificación de especies de nematodos presentes en cada muestra. Para corroborar la clasificación inicial se colocaron los nematodos en portaobjetos y se observaron al microscopio óptico.

El porcentaje de eficacia (TEC) fue calculado según McKenna (1997) mediante la fórmula: % Eficacia= $((X_a \text{ en C} - X_a \text{ en T}) / X_a \text{ en C}) * 100$, donde X_a es la media aritmética de una especie parasitaria "a", T es el grupo tratado y C es el grupo control.

Para la determinación del %RCH en los tratamientos individuales, tanto al inicio (año 2014) como al final (año 2018) del período experimental, los animales fueron divididos en los siguientes 4 grupos experimentales:

Grupo control, animales sin tratamiento antihelmíntico;

Grupo MOX, tratados con MOX (Cydectin Alfa® 1%, Zoetis, Argentina) (SC) a la dosis terapéutica (0,2 mg/kg);

Grupo LEV, tratados con LEV (Fosfamisol MV® 22.3%, Biogénesis Bagó, Argentina) (SC) a la dosis terapéutica (8 mg/kg);

Grupo MOX+LEV, tratados con MOX y LEV (ambos por vía SC) en forma conjunta a la dosis terapéutica (0,2 y 8 mg/kg, respectivamente).

Los tratamientos fueron realizados por la vía SC en la cara interna del muslo, cabe mencionar que la co-administración fue realizada en cada muslo del animal.

Los animales que recibieron el tratamiento individual permanecieron en corrales de cemento alimentados con fardos de alfalfa y agua *ad libitum*. Luego de colectadas las muestras de materia fecal post tratamiento y calculado el porcentaje de reducción para ambos grupos, todos los corderos recibieron tratamiento con la co-administración de MOX y LEV por vía SC a las dosis recomendadas y luego de 72 h fueron reintroducidos en el potrero experimental.

El cálculo del %RCH y de los respectivos intervalos de confianza se realizó siguiendo los criterios de la WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology), se utilizó la fórmula: $\% RCH = 100 * (1 - X_t / X_c)$ donde X_t es la media aritmética del grupo tratado y X_c es la media aritmética del grupo control al día 7 post tratamiento para el grupo LEV y al día 14 post-tratamiento para los grupos MOX y MOX+LEV (Coles *et al.*, 1992).

Por otra parte, se evaluó el impacto de esta estrategia farmacológica sobre la población parasitaria en el ambiente donde se encontraban los animales. Para ello, se determinó en forma mensual el grado de infestividad de las pasturas por la técnica manual de lavado de pasto y recuperación de larvas infestivas (MAFF, 1986).

2. 2. 3 Análisis estadístico

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

El cálculo del %RCH y de los respectivos intervalos de confianza se realizó siguiendo los criterios de la WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) (Coles *et al.*, 1992).

2. 2. 4 Resultados

El porcentaje de reducción de la cuenta de huevos para el tratamiento combinado de MOX y LEV a lo largo de todo el periodo experimental (4 años) osciló de 77 a 100%. El valor máximo (100%) se obtuvo al inicio (junio, 2014) seguido de 99% en el mismo año. Para los años siguientes estos porcentajes fluctuaron entre 96 y 77%. Las L3 recuperadas de los cultivos post-tratamiento indicaron que los géneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus* y *Teladorsagia* fueron los únicos capaces de sobrevivir a la acción combinada de ambos fármacos. Para el caso particular de *H. contortus* los valores de eficacia fueron al inicio de 100% y al final del periodo experimental de 99%. Sin embargo, se observaron algunas oscilaciones en algunas evaluaciones intermedias como la del 06/07/2017 donde la reducción general fue del 77 % siendo la eficacia por genero para *Haemonchus* del 89 %. En la Tabla 4 se muestran los porcentajes de

reducción en la cuenta de huevos y los géneros parasitarios recuperados pre y post tratamiento combinado con MOX y LEV.

Tabla 4: Porcentaje de reducción del conteo de huevos (%RCH) y géneros parasitarios recuperados de los cultivos de materia fecal pre y post tratamientos combinados con MOX+LEV en ovinos naturalmente infestados. La eficacia sobre cada género fue calculada mediante la división entre los promedios de los conteos de hpg pre y post tratamiento con su respectiva proporción de L3.

Fecha	RCH (%) [*]	[IC] [*]	% de L3 en los coprocultivos pre y post-tratamiento (eficacia sobre cada género)				
			<i>Haemonchus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Chabertia</i>
18/06/2014	100	Pre	58	16	6	20	0
			[100-100]	Post	0 (100)	0 (100)	0 (100)
03/10/2014	99	Pre	48	28	12	10	0
			[95-100]	Post	SD	SD	SD
17/04/2015	85	Pre	94	4	2	0	0
			[69-93]	Post	90 (86)	8 (71)	2 (85)
23/07/2015	84	Pre	42	0	32	22	0
			[74-90]	Post	28 (89)	32	34 (83)
24/09/2015	92	Pre	62	14	26	0	0
			[56-98]	Post	0 (100)	66 (60)	34 (9)
09/03/2016	96	Pre	56	10	12	8	14
			[88-99]	Post	SD	SD	SD
17/05/2016	95	Pre	56	10	30	0	4
			[80-99]	Post	4 (99)	56 (71)	40 (93)
19/07/2016	90	Pre	42	36	18	2	2
			[81-95]	Post	0 (100)	62 (83)	32 (82)
03/05/2017	91	Pre	58	14	24	2	0
			[74-97]	Post	52 (94)	24 (88)	24 (93)
06/07/2017	77	Pre	60	40	0	0	0
			[56-88]	Post	28 (89)	52 (71)	20
22/09/2017	90	Pre	50	40	10	0	0
			[72-97]	Post	SD	SD	SD
12/07/2018	87	Pre	70	16	14	0	0
			[71-94]	Post	8 (99)	28 (78)	64 (42)

SD: Sin desarrollo larval. [IC]= intervalo de confianza (95%). ^{*}Calculado según Coles *et al.* (1992).

La eficacia clínica inicial (2014) de los tratamientos individuales fue de 99% para MOX y de 85% para LEV. Luego de los repetidos tratamientos combinados a lo largo de 4 años de trabajo, estos mismos porcentajes de eficacia descendieron a 42% para MOX y 69% para LEV, siendo *Trichostrongylus* spp el principal género recuperado de los coprocultivos post tratamiento. Para el caso de MOX, esta reducción en la eficacia puede considerarse significativa al no haber superposición en los intervalos de confianza. En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de reducción de la cuenta de huevos (TRCH) para MOX y LEV y su eficacia sobre los diferentes géneros parasitarios recuperados del coprocultivo al inicio y al final del estudio *in vivo*.

Tabla 5: Media aritmética del conteo huevos por gramo de material fecal, amplitud y porcentaje de reducción obtenidos luego del tratamiento individual con moxidectina (MOX) o levamisol (LEV) al inicio y al final del período experimental. La eficacia sobre los diferentes géneros parasitarios fue calculada dividiendo el promedio del HPG de cada grupo tratado al día 7 (LEV) o al día 14 (MOX) por el respectivo porcentaje de L3 de cada género en particular recuperadas del coprocultivo post tratamiento.

	Tratamiento	Media aritmética del HPG		TRCH (%)* [IC]	% Eficacia sobre cada género				
		(amplitud)			<i>Haemonchus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Chabertia</i>
		Día 0	Día 7-14						
Inicio (2014)	Control	2842 (165-6960)	5442 ^a (270-16010)	-					
	MOX	2868 (405-10710)	43 ^b (0-180)	99 [97-100]	99	99	99	99	100
	LEV	2417 (165-7440)	792 ^a (0-1800)	85 [65-94]	100	67	56	96	95
Fin (2018)	Control	1846 (360-8240)	2266 ^a (690-8580)	-					
	MOX	2447 (520-6800)	1320 ^a (270-3160)	42 [0-76]	85	87	30	-	100
	LEV	2978 (160-11800)	704 ^b (0-2520)	69 [9-89]	87	38	0	0	100

IC= intervalo de confianza (95%). *Calculado según Coles *et al.* (1992). Letras diferentes sobre los valores de conteo de huevos por gramo de material fecal a los días 7 (LEV) o 14 (MOX) post tratamientos indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Para el caso del TEC, en el tratamiento combinado de MOX+LEV al inicio del periodo experimental se obtuvieron valores de eficacia altos (entre 84,3 y 100%) contra todas las especies de parásitos recuperadas. Luego de 4 años de control parasitario basado en el uso exclusivo del tratamiento combinado (con un total de 12 tratamientos), la eficacia final observada (2018) permaneció sin modificaciones considerables, a excepción de *T. colubriformis* que mostró una disminución de 97,4% (año 2014) a 58% (año 2018). De hecho, no se observaron diferencias significativas en los conteos de parásitos adultos de *T. colubriformis* entre el grupo tratado y el control al final del periodo experimental.

La carga total de parásitos recuperada al final del estudio representó sólo el 15% de la obtenida al inicio. En ambos casos, *T. colubriformis* fue la especie más prevalente (entre 90% y 83% del total de la población parasitaria). Para el caso de *H. contortus* los conteos fueron similares en ambos momentos (media aritmética de 4590 y de 3830 para el grupo control al inicio y al final del estudio, respectivamente). En la Tabla 6 se muestran los conteos de parásitos recuperados y los porcentajes de eficacia obtenidos para el tratamiento combinado de MOX+LEV al inicio y al final del periodo experimental.

Tabla 6: Conteo de parásitos adultos recuperados del tracto gastrointestinal (media aritmética y rango) y eficacia (%) obtenida luego del tratamiento combinado con MOX+LEV en corderos naturalmente infestados al inicio y al final del periodo experimental (n=6 por grupo).

	Eficacia inicial (2014)			Eficacia final (2018)		
	Control	MOX+LEV	Eficacia* (%)	Control	MOX+LEV	Eficacia* (%)
<i>Haemonchus contortus</i>	765 ^a (0-1920)	120 ^a (0-720)	84,3	638,3 ^a (0-1180)	0 ^b	100
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	1450 ^a (290-2850)	0 ^b	100	76,7 ^a (0-370)	0 ^a	100
<i>Trichostrongylus axei</i>	8033 ^a (0-2290)	0 ^b	100	0 ^a	0 ^a	100
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	27693.3 ^a (970-104000)	711 ^b (0-2540)	97,4	3945 ^a (480-17900)	1675 ^a (0-7180)	58

*Calculado según McKenna, (1997). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los conteos de los grupos control y tratado.

Durante todo el periodo experimental los animales estuvieron expuestos a bajos niveles de exposición parasitaria dado los bajos conteos de L3 en la pastura, según el criterio señalado por Taylor *et al* (2016). Al inicio del ensayo *in vivo* (mayo de 2014) se recuperaron 20 L3/kg de pasto seco, caracterizadas por los géneros *Haemonchus* (20%), *Teladorsagia* (40%) y *Cooperia* (40%). Para los años siguientes la cantidad de L3 recuperadas en la pastura antes del ingreso de los animales experimentales estuvo en el rango de 20 a 58 L3/kg de pasto seco y permaneció en similar condición a lo largo de todo el periodo experimental, a excepción de un muestreo en julio de 2017, posterior a intensas lluvias, que arrojó un resultado de 1000 L3/kg de pasto seco. La Figura 7 muestra las fluctuaciones en la infestividad de la pastura, medida como número de L3 por kg de pasto seco a lo largo de todo el periodo experimental.

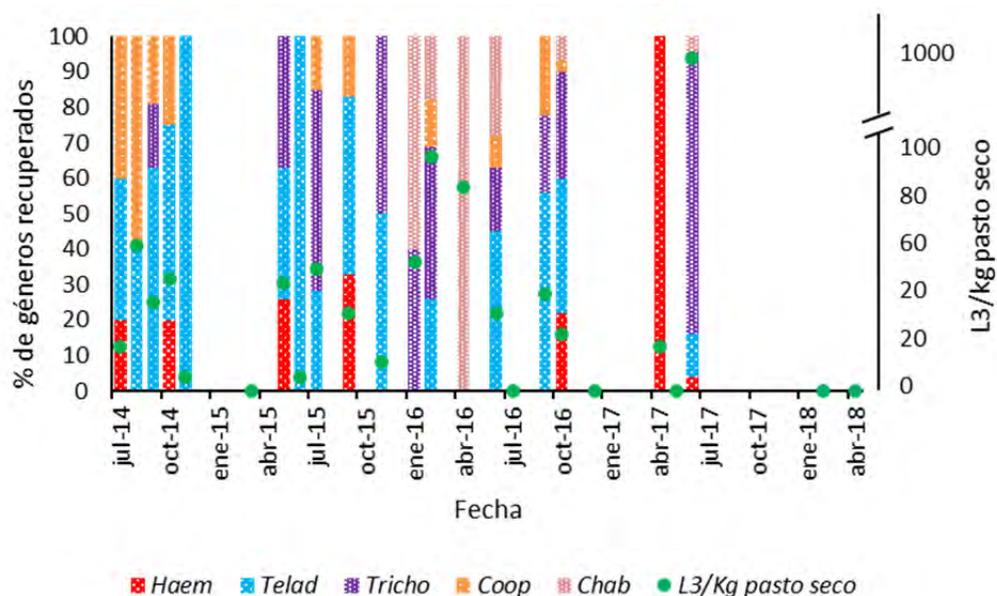


Figura 7: Cantidad de larvas infestantes (L3) por kg de pasto seco recuperadas de los lavados de pasto a lo largo de todo el periodo experimental (puntos verdes) y porcentaje de géneros presentes en la muestra (barras apiladas).

En la siguiente figura se presentan los datos climáticos en referencia a temperatura media y precipitación acumulada mensual registradas durante el período de estudio. Los mismos fueron obtenidos por la estación meteorológica de la EEA-INTA Balcarce que se encuentra ubicada a 12,5 km de distancia del potrero experimental de la Reserva 8 en dónde fueron realizados los ensayos *in vivo*.

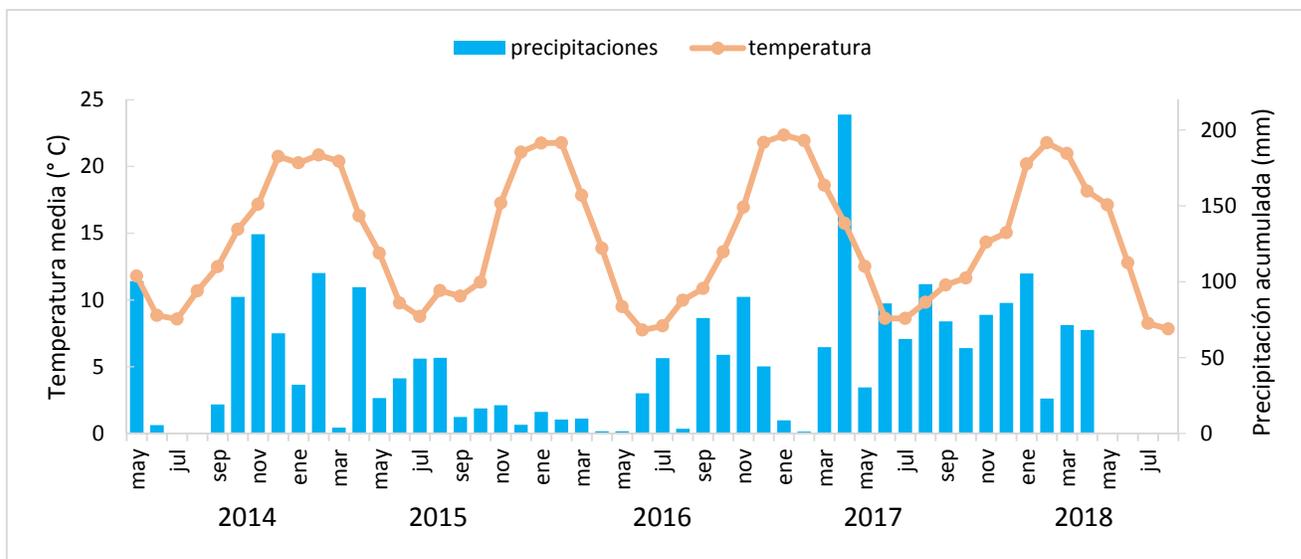


Figura 8: Temperaturas medias (° C) y precipitaciones mensuales acumuladas (mm) registradas durante el transcurso del estudio.

2. 2. 5 Principales aportes

A continuación, se resumen los principales aportes de esta sección experimental, los mismos se discuten en forma integral en la Discusión General (Capítulo IV) de la presente Tesis:

- Se obtuvieron, en general, niveles altos de reducción en la cuenta de huevos (RCH) para la administración combinada MOX+LEV. Sin embargo, luego del primer año de estudio, la eficacia estuvo en varias ocasiones por debajo del 95 % y el límite inferior del intervalo de confianza por debajo del 90 % lo que podría ser un indicio de resistencia.
- En la etapa final del período experimental el porcentaje de RCH del tratamiento combinado fue mayor que el obtenido para cada fármaco de manera individual, lo que podría indicar un efecto aditivo entre MOX y LEV.
- En las condiciones de estudio descritas, la combinación MOX+LEV mostró buenos niveles de eficacia sobre las especies parasitarias de localización abomasal.
- Luego de cuatro años de uso de la combinación MOX+LEV como único tratamiento se observó el desarrollo de resistencia múltiple en *T. colubriformis*.
- Los conteos de HPG a lo largo del año reflejaron la epidemiología parasitaria propia de la región. Las larvas infestantes (L3) recuperadas de los muestreos de pasto se

mantuvieron en valores bajos, en parte debido al bajo porcentaje de recuperación que posee la técnica de lavado y la baja carga animal utilizada.

CAPÍTULO III

“Caracterización fenotípica y cuantificación de la expresión de Gp-P en la población parasitaria sometida a presión de selección con la combinación MOX+LEV (estudios *in vitro*)”

3. Introducción

Debido a las limitaciones de sensibilidad y especificidad que posee el diagnóstico *in vivo* de la resistencia antihelmíntica, en los últimos años se han desarrollado alternativas de diagnóstico en el laboratorio. Una alternativa son las pruebas *in vitro* realizadas sobre los estadios de vida libre de los parásitos, en las cuales se determina la susceptibilidad/resistencia al exponer los mismos a un rango de concentraciones de fármaco que permita la construcción de las curvas dosis-respuesta y la determinación de las respectivas dosis inhibitorias (DI).

Por otro lado, las pruebas moleculares, en asociación con el conocimiento de los mecanismos genéticos que intervienen en este fenómeno, han sido propuestas como métodos complementarios para el diagnóstico convencional. Sin embargo, no se incluyen aún en la rutina diagnóstica debido a los elevados costos de equipamiento e insumos y a la incertidumbre sobre su aplicabilidad a campo por la insuficiente estandarización de resultados.

Para la caracterización *in vitro* de los niveles de resistencia a MOX y LEV, en este trabajo de Tesis se utilizó el test de inhibición de la migración larval (TIML), donde se miden los efectos de los fármacos evaluando la capacidad de las larvas de migrar activamente a través de una malla de 25 μm . Este test presenta como ventajas la posibilidad de evaluar la efectividad de los tres grupos de antiparasitarios más utilizados: BZD, LM e imidazotiazoles (Demeler *et al.*, 2010^b).

Mediante estas pruebas *in vitro* se pueden calcular las dosis inhibitorias 50 y/o 99 de la población parasitaria estudiada y compararlas con las obtenidas en una población susceptible de la misma especie (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2009). La falta de correlación muchas veces observada entre los resultados obtenidos a partir de técnicas *in vitro* y aquellos obtenidos bajo condiciones *in vivo*, han dificultado el uso estandarizado de las primeras para el diagnóstico de resistencia a campo. Sin embargo, son una alternativa complementaria a la hora de caracterizar fenotípicamente una población parasitaria específica.

La genética de la resistencia antihelmíntica es compleja, siendo muy dificultoso identificar marcadores de resistencia debido a que cada especie de parásito parece

exhibir diferentes patrones. Además, los diferentes modos de acción de los antihelmínticos hacen que cada grupo químico pueda potencialmente evidenciar un distinto mecanismo de resistencia.

El conocimiento limitado de las bases moleculares de la resistencia en conjunto con la resistencia poligénica a LEV (Sangster *et al.*, 1991) y a las LM (McCavera *et al.*, 2007) hace mucho más complejo el desarrollo de marcadores moleculares para estos grupos químicos. Además, tampoco se ha podido determinar con certeza el valor umbral de la frecuencia de genes resistentes a partir del cual se puede establecer que la población parasitaria sea resistente. Por otro lado, también existen mecanismos inespecíficos por los cuales los parásitos podrían sobrevivir al tratamiento con un fármaco. El incremento de la frecuencia de expresión de la glicoproteína de eflujo (Gp-P) de los nematodos luego de la exposición *in vivo* como *in vitro* frente a los antihelmínticos ha sido señalada como uno de estos mecanismos de resistencia (Dicker *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 2011; De Graef *et al.*, 2013).

La fase experimental del presente capítulo plantea caracterizar la población parasitaria sometida a presión de selección con la combinación MOX+LEV de los ensayos *in vivo* mediante dos secciones experimentales. En la primera de ellas, se realizó la caracterización fenotípica mediante el TIML frente a MOX y LEV, mientras que en la segunda se realizó la cuantificación de los niveles de expresión relativa de 3 diferentes Gp-P (Gp-P 2, Gp-P 3 y Gp-P 17) en respuesta al tratamiento combinado de MOX y LEV por el transcurso de 4 años de ensayos *in vivo*.

3. 1 Sección Experimental I

“Caracterización fenotípica del aislamiento parasitario sometido a presión de selección con la combinación MOX+LEV”

3. 1. 1 Objetivo específico

- Comparar fenotípicamente (TIML) la población parasitaria sometida a presión de selección con MOX y LEV y un aislamiento susceptible de *H. contortus* de referencia.

3. 1. 2 Metodología experimental

Para la presente sección experimental se trabajó con la técnica de diagnóstico *in vitro* de inhibición de la migración larval (TIML) que es apropiada para evaluar los efectos tanto de MOX como de LEV sobre L3 de nematodos gastrointestinales (Demeler, *et al.* 2010^a). Durante el período de estandarización inicial se corroboró la migración de todos los géneros parasitarios en un porcentaje mayor a 90%.

Se trabajó con los aislamientos parasitarios de inicio y fin del periodo experimental y también, como control positivo, un aislamiento de *H. contortus* susceptible (obtenido por el Centro de Diagnóstico Veterinario, CEDIVE, Chascomús).

Para el aislamiento de las cepas parasitarias mixtas de inicio y fin se colectaron muestras de materia fecal de los animales alojados en el potrero experimental, luego de corroborada la presencia de huevos mediante hpg se realizó un macro coprocultivo para obtener las L3. La materia fecal se maceró con Telgopor granulado y se incubó durante 15 días a temperatura (24°C) y humedad controlada (70%).

La recuperación de las larvas se efectuó mediante la técnica de Baermann, en la cual el cultivo de materia fecal se colocó dentro de una bolsa de gasa doble sumergida en un vaso cónico con agua destilada a temperatura ambiente. Pasadas 24 h se recuperaron las L3 tomando alícuotas de la solución del fondo del recipiente. La suspensión de las larvas obtenidas fue diluida hasta obtener alícuotas con una concentración de 1000 L3 y se identificaron los géneros presentes por observación al microscopio óptico (Niec, 1968).

Las suspensiones de L3 fueron utilizadas inmediatamente para la inoculación de animales dadores o almacenadas en botellas de cultivo celular en heladera por un tiempo no mayor a 2 meses y, antes de ser utilizadas en las pruebas *in vitro*, fueron pasadas por un Baermann con filtro de 25µm durante 1 hora a 23°C.

Con el fin de mantener en el tiempo los aislamientos parasitarios, con las L3 obtenidas se infestaron artificialmente corderos dadores con valor 0 de hpg (de sucesivos muestreos no consecutivos), los corderos dadores fueron mantenidos en corrales con piso de cemento, alimentados con cubos de alfalfa y silo de maíz y agua *ad libitum*.

3. 1. 3 Test de inhibición de la migración larval (TIML)

Para la realización de estas pruebas las soluciones de los fármacos fueron preparadas utilizando los productos comerciales, según lo recomendado por Kotze *et al.* (2014). Se

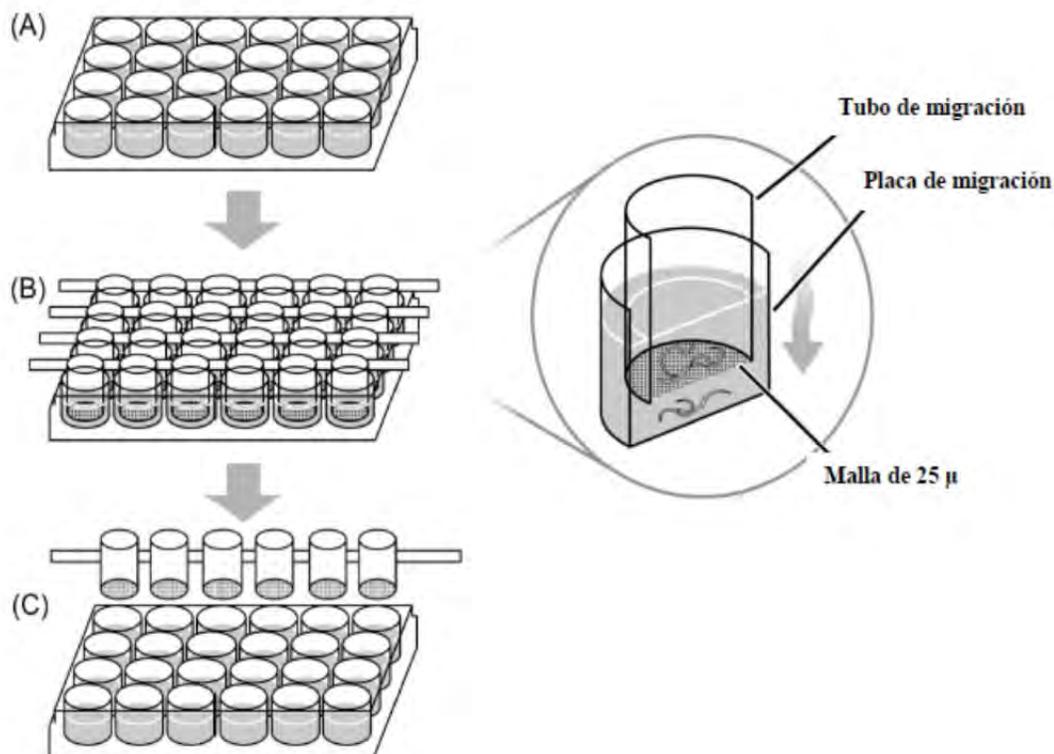
realizaron sucesivas diluciones en dimetilsulfóxido (DMSO al 100 %) para obtener 10 (MOX) y 8 (LEV) concentraciones diferentes de los fármacos y una concentración final máxima de DMSO en cada pocillo de 0,5 %. Las concentraciones finales de MOX fueron del rango de 2 ng/ml a 25000 ng/ml y para LEV de 0,03 µg/ml a 22 µg/ml.

Para el caso de las incubaciones con ambas moléculas se iniciaron las pruebas con las concentraciones máximas individuales (25000 ng/ml MOX y 22 µg/ml LEV) de manera conjunta, para el resto de las incubaciones se utilizó el mismo criterio para combinarlas, con lo cual se obtuvieron 8 soluciones y una concentración mínima final para 9 ng/ml de MOX y 0,03 µg/ml de LEV.

Se utilizaron placas de cultivo celular de 24 pocillos. En cada pocillo de la primera placa (placa de incubación) se colocaron entre 80 a 100 larvas en suspensión, se les adicionaron 90 µl de la solución de los fármacos individuales o combinados en diferentes concentraciones y agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 1,8 ml. Posteriormente, las placas se incubaron por 24 horas en oscuridad a 24 °C en estufa biológica.

Transcurrido este tiempo, el contenido completo de cada pocillo fue transferido a través de un filtro de 25 µm, según lo recomendado por Demeler *et al.* (2010^a), suspendido en las filas A y C (Figura 9) de una segunda placa (placa de migración). La placa de migración completa se colocó en una estufa biológica por 24 horas a 25 °C. Se chequeó mediante la observación directa en microscopio. Por cada placa de incubación se utilizaron dos placas de migración.

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



(Lloberas, 2018)

Figura 9: Sistema de migración. A: Placa de incubación; B: Placa de migración; C: Placa de lectura. Ampliado: sistema de filtro para migración.

Cada aislamiento se sometió a 10 concentraciones, en el caso de MOX, y 8 concentraciones, en el caso de LEV, con 4 repeticiones por concentración en cada placa y por duplicado (2 placas de incubación por vez). A su vez se realizaron al menos 3 pruebas completas para cada aislamiento.

Se incluyó en cada prueba, un control negativo (sin fármaco), cuyo valor mínimo aceptable de migración fue establecido en 90%, y un control positivo (DMSO 10%). Para cada concentración y cada control se calculó el porcentaje de inhibición, corrigiendo los datos con el otro negativo, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición: } (\text{Número de larvas no migradas} / \text{Número total de larvas}) * 100$$

3. 1. 4 Análisis estadístico

Para ajustar los datos a una curva dosis respuesta mediante una regresión no lineal, se utilizó una ecuación logística de cuatro parámetros, utilizando el programa GraphPad Prism (versión 6). Se realizó la transformación logarítmica de la variable independiente (concentración) ($X = \log X$).

Se calculó la dosis inhibitoria 50 (DI50) y el intervalo del 95 % de confianza (IC 95 %).

3. 1. 5 Resultados

Se trabajó con los aislamientos parasitarios de inicio y fin del periodo experimental cuya composición genérica se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Porcentaje (%) de géneros parasitarios presentes en los aislamientos parasitarios mixtos de inicio y fin del período experimental que fueron utilizados en las pruebas *in vitro*.

% de géneros presentes en los aislamientos parasitarios					
	<i>Haemonchus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Chabertia</i>
Inicio	58	16	6	20	0
Fin	70	16	14	0	0

Durante la estandarización de la prueba se corroboró la migración de todos los géneros parasitarios presentes en los aislamientos mixtos, los resultados obtenidos (Tabla 8) corresponden a 8 repeticiones de incubaciones en placas control (sin fármaco).

Tabla 8: Porcentaje de migración larval obtenido para los aislamientos parasitarios mixtos incubados en ausencia de fármacos (n=8).

% de migración larval control				
	<i>Haemonchus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Cooperia</i>
Aislamiento inicial	91,7	86,5	91,2	85
Aislamiento final	88,9	88	87,3	-

Se probó el efecto de MOX y LEV incubados de manera individual o combinada sobre los aislamientos parasitarios de inicio y fin del período experimental y sobre el aislamiento de *H. contortus* susceptible (CEDIVE) como control. Para cada uno de los aislamientos y cada fármaco individual se obtuvo una curva dosis-respuesta con una bondad de ajuste entre 87-93%. Se obtuvieron resultados similares dentro de cada aislamiento con un coeficiente de variación menor a 20%.

En las Figuras 10 y 11 se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas para los tres aislamientos parasitarios incubados a concentraciones crecientes de MOX y de LEV, respectivamente.

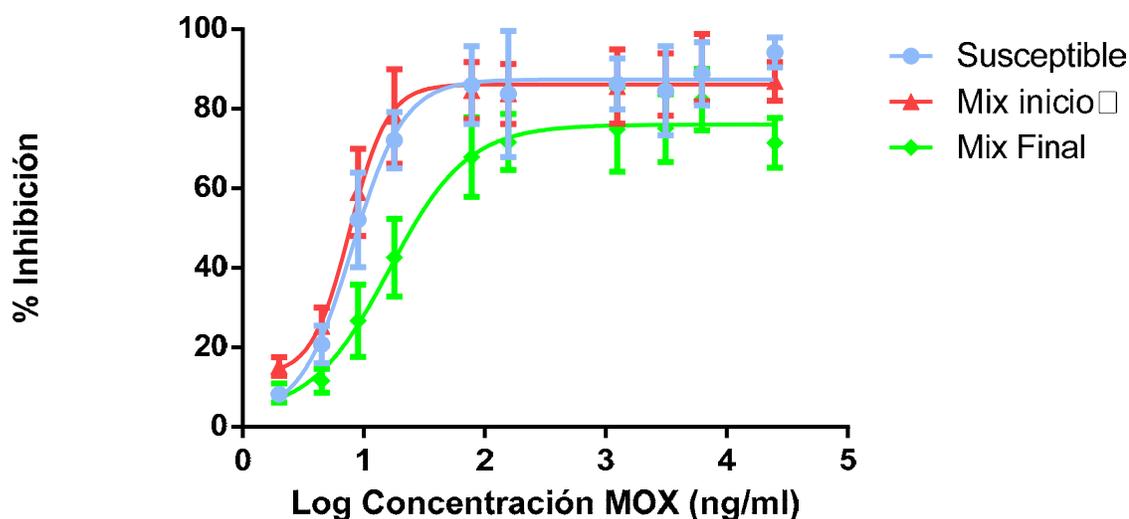


Figura 10: Actividad de moxidectina (MOX) expresada como inhibición de la migración larval (%) en los aislamientos parasitarios de inicio y fin del periodo experimental *in vivo* y en el aislamiento de *H. contortus* susceptible.

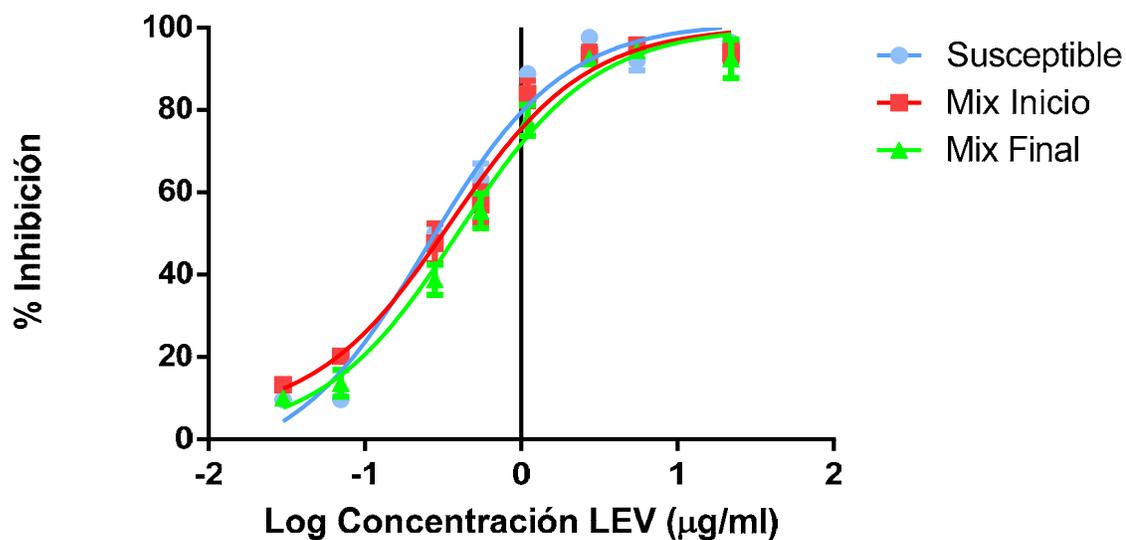


Figura 11: Actividad de levamisol (LEV) expresada como inhibición de la migración larval (%) en los aislamientos parasitarios de inicio y fin del periodo experimental *in vivo* y en el aislamiento de *H. contortus* susceptible.

En la Tabla 9 se presentan los diferentes parámetros calculados en la prueba de inhibición de la migración larval para MOX y LEV incubados de manera individual.

Tabla 9: Parámetros obtenidos del análisis de las curvas dosis-respuesta para MOX y LEV sobre los aislamientos parasitarios de inicio y fin del ensayo *in vivo* y sobre el aislamiento de *H. contortus* susceptible.

		<i>H. contortus</i> susceptible	Mixta Inicial	Mixta Final
MOX	DI50 (ng/ml)	8,06 ^a	7,68 ^a	16,28 ^b
	IC (95%) (ng/ml)	6,9 - 9,4	6,9 – 8,5	13,1 – 20,2
	DI90 (ng/ml)	23,7 ^a	16,9 ^a	83,3 ^b
	IC (95%) (ng/ml)	18,9 – 29,7	14,2 – 20,2	57,2 – 121,4
	R ²	0,91	0,92	0,91
LEV	DI50 (µg/ml)	0,25 ^a	0,35 ^a	0,4 ^a
	IC (95%) (µg/ml)	0,2 – 0,32	0,26 – 0,47	0,3 – 0,5
	DI90 (µg/ml)	1,27 ^a	2,02 ^a	1,94 ^a
	IC (95%) (µg/ml)	0,97 - 1,6	1,24 – 3,3	1,2 - 3
	R ²	0,93	0,89	0,87

DI50: Dosis inhibitoria 50. DI90: Dosis inhibitoria 90 IC: intervalo del 95% de confianza. R2: coeficientes de determinación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los resultados de DI50 para cada fármaco evaluado, las mismas fueron determinadas en función de la superposición de los IC.

En el caso de la incubación conjunta de MOX y LEV, las concentraciones más bajas utilizadas (MOX: 9 ng/ml y LEV: 0,03 µg/ml) de ambos fármacos lograron inhibir la migración larval en un porcentaje superior al 80% para los tres aislamientos parasitarios (83% *H. contortus* susceptible, 86% aislamiento de inicio y 87% aislamiento de fin del ensayo *in vivo*). Con los valores obtenidos para las concentraciones testeadas no fue posible estimar los valores de DI50. A modo de ejemplo, la Tabla 10 muestra los porcentajes de inhibición obtenidos para las primeras concentraciones ensayadas.

Tabla 10: inhibición de la migración larval (%) e intervalo de confianza (95%) obtenido para las primeras concentraciones ensayadas de los fármacos MOX y LEV incubados de manera conjunta.

Concentraciones		Aislamientos parasitarios		
MOX (ng/ml)	LEV (µg/ml)	<i>H. contortus</i> susceptible	Mix inicial	Mix final
9	0,03	83 % (76-90)	86 % (82-90)	87 % (81-92)
18	0,07	89,6 % (85-94)	91,9 % (89-94)	85,5 % (79-91)
78	0,28	91,9 % (89-95)	91,9 % (90-96)	93,1 % (90-95)
156,5	0,55	95 % (92-96)	95 % (93-97)	94,1 % (93-95)

3. 1. 6 Principales aportes

A continuación, se resumen los principales aportes de esta sección experimental. Los mismos se discuten en forma integral en la Discusión General (Capítulo IV) de la presente Tesis:

- Los aislamientos parasitarios estudiados evidenciaron un comportamiento dosis dependiente frente a ambos fármacos (MOX y LEV).
- Para MOX se observó un aumento de la DI 50 en el aislamiento mixto final respecto del aislamiento inicial y a los valores obtenidos para *H. contortus* susceptible usado como control positivo, siendo estadísticamente significativo el aumento con respecto al aislamiento inicial.
- En el caso de LEV, la DI50 del aislamiento mixto final no mostró diferencias respecto a los aislamientos mixto inicial y susceptible de *H. contortus*.
- La combinación de fármacos (MOX y LEV) evidenció un aumento del efecto observado *in vitro* sobre la migración larval, en relación a las incubaciones con los fármacos de manera individual.

3. 2 Sección experimental II

“Cuantificación de la expresión genética del transportador celular Gp-P en *H. contortus* expuestos *in vivo* a la combinación MOX+LEV”

3. 2. 1 Objetivo específico

- Comparar la expresión de Gp-P en aislamientos de *H. contortus* obtenidos al inicio (no expuestos al tratamiento combinado) y al final (expuestos al tratamiento combinado) del periodo experimental.

3. 2. 2 Metodología experimental

En esta sección experimental se realizó la cuantificación de la expresión genética del transportador celular Gp-P en los aislamientos de *H. contortus* al inicio y al final del periodo experimental.

Se trabajó con ejemplares adultos machos de *H. contortus* obtenidos mediante la necropsia de los animales del grupo control de la prueba de eficacia controlada (descrita en el Capítulo II, ensayos *in vivo*) tanto al inicio como al final del período experimental (4 años). Una vez recuperados los parásitos, fueron inmediatamente almacenados en RNAlater® y posteriormente conservados a -80°C hasta su procesamiento.

3. 2. 3 Aislamiento y cuantificación de ARN

Se procedió a la extracción del ARN total (ARNt) de pools de aproximadamente 50 ejemplares de *H. contortus*, mediante la utilización del reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Brevemente, los parásitos se homogenizaron en mortero manteniendo el congelamiento con N₂ líquido, y el material resultante de la homogenización se colocó en un eppendorf conteniendo 500 µl de Trizol. Después de unos minutos, se procedió a la recuperación del ARNt desde la fase clorofórmica, mediante el agregado de 150 µl de CHCl₃, agitación y centrifugación durante 15 min a 13000 rpm y a 4°C. El ARNt se sometió a precipitación mediante el agregado de 500 µl de isopropanol, enfriamiento a -80°C durante 15 minutos, y posterior centrifugación a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos más. El precipitado resultante se lavó con 1 ml de

etanol 75 % en agua y se re-suspendió con vórtex. Nuevamente las muestras se centrifugaron a una velocidad de 7500 rpm. El precipitado resultante se re-suspendió en 20 µl de agua libre de RNAsas (Invitrogen) y se incubó en baño María a una temperatura de 55-60 °C por 5 minutos para lograr la completa disolución del ARNt obtenido. Posteriormente, el ARN se congeló a -70°C hasta su utilización. La calidad, concentración y grado de pureza del ARNt obtenido se determinaron mediante la utilización en un nanodrop (Thermo Fisher, USA) y corrida electroforética en agarosa al 0,8 %.

3. 2. 4 Transcripción reversa. Síntesis de ADNc

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

3. 2. 5 PCR en tiempo real

Las secuencias blanco de ARNm de *H. contortus* y los genes de referencia fueron obtenidos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los primers utilizados para el análisis de la expresión y cuantificación de Gp-P 2, fueron diseñados utilizando el programa Primer Express™ Software 2.0 (Applied Biosystems) basados en las secuencias publicadas por Xu *et al.* (1998) para Gp-P 2. Los demás juegos de primers utilizados para la amplificación del ARNm de *H. contortus* fueron obtenidos de las secuencias publicadas en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) cada juego de primers fue optimizado en un rango de 200-500 nM para identificar la concentración de primers que amplifica el fragmento de ADN de interés con la mayor eficiencia.

Las características de los primers utilizados para la cuantificación mediante qPCR se presentan en la Tabla 11, a continuación.

Tabla 11: Primers y números de acceso de GenBank utilizados para la cuantificación de la expresión relativa por qPCR.

Nombre del gen en <i>H. contortus</i>	Secuencia primer (5'→3')	Tamaños del producto de amplificación (pb)	GenBank N° de acceso/Cita
ACT	F: GCTCCCAGCACGATGAAAA R: CACCAATCCAGACAGATATTGTC	66	DQ080917 (Kotze y Bagnall, 2006)
Hco-pgp-17	F: GACTTTCAGCTACCCATCACG R: GTCCGGTTTCGTAGAAATCTCTC		HM635772 (Williamson et al, 2010)
Hco-pgp-2	F: CGGCAGCAGATCTCATGGT R: TCGGTTAGACGAGCTGTGAGATT	61	AF003908 (Xu et al., 1998)
Hco-pgp-3	F: TGAACCTAAGCGTCCGACATG R: TAGTGATTCCACACAAAGCATCG		HM635768 (Williamson et al., 2010)

Los niveles de expresión relativa de los amplicones Hco-pgp2, Hco-pgp3 y Hco-pgp17 se cuantificaron utilizando el equipo ABI Prism 7500 (Applied Biosystems SA). La amplificación específica del gen se confirmó mediante el análisis de la curva de fusión.

Cada una de las reacciones fue preparada en una mezcla de reacción con las siguientes proporciones: 10 µl de PCR SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 2 µl de cada juego de Primers (200 nM), 1 µl de ADNc diluído 1:250 y 7 µl de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 20 µl por reacción. Se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pocillos y cada muestra se procesó por duplicado.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: pre incubación a 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, luego 95 °C por 15 segundos (desnaturalización) y 60 °C por 1 minuto (extensión). Se realizaron 40 ciclos de desnaturalización y extensión. Finalmente se realizó la curva de melting para chequear la formación de un único producto de amplificación.

Previamente a la cuantificación de las muestras experimentales se procedió a la validación de cada juego de primers utilizado para la cuantificación. Para ellos se construyeron curvas de las muestras a cuantificar. Se seleccionaron para la cuantificación aquellos juegos de primers cuyas curvas arrojaron valores de pendiente entre -3,6 y -3,25 y r^2 superiores a 0,985.

3. 2. 6 Análisis estadístico

La determinación de la expresión relativa de los ARNm de Gp-P 2, Gp-P 3 y Gp-P 17 se llevó a cabo por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), corrigiendo la eficiencia de amplificación calculada para cada par de primers durante la etapa de validación (Eficiencia: $2^{-1/\text{slope}}$). Se utilizó la prueba T de Student no emparejada o el test no paramétrico Mann Whitney, cuando fue necesario, para comparar los resultados de la expresión de Hco-pgp obtenidos en los grupos de inicio y fin de los ensayos *in vivo*. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

3. 2. 7 Resultados

3. 2. 7. 1 Validación de la eficiencia de la PCR en tiempo real

Las curvas de validación fueron realizadas con cantidades decrecientes de ADNc en pool diluidas a intervalos de 5 veces para evaluar la eficiencia de la PCR en tiempo real y los valores considerados aceptables fueron los recomendados por la guía de ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem S.A.). La Tabla 12 presenta los resultados de la validación obtenida.

Tabla 12: Principales parámetros obtenidos en la validación de los primers utilizados para la cuantificación de la expresión genética

Primer	Pendiente	R2	Rango de amplificación	Eficiencia
ACT	-3,6	0,99	18,6-25,6	1,86
Hco-gp-p17	-3,8	0,992	23-33	1,82
Hco-gp-p2	-3,52	0,994	22,06-32,64	1,92
Hco-gp-p3	-3,3	0,985	26-34	1,99

3. 2. 7. 2 Cuantificación relativa de Gp-P 2, Gp-P 3 y Gp-P 17 en *H. contortus*

En la presente sección experimental se cuantificó la expresión de las Gp-P 2, Gp-P 3 y Gp-P 17 en especímenes adultos machos de *H. contortus* recuperados de los ovinos alojados en el potrero experimental tanto al inicio como al final, es decir luego de 4 años

de tratamientos con la combinación MOX+LEV con el fin de establecer el patrón de la expresión relativa de cada aislamiento.

La cuantificación relativa mostró que la expresión del gen que codifica la Gp-P 3 fue significativamente mayor ($p \leq 0,03$) en los machos de *H. contortus* recuperados de los animales al finalizar los ensayos experimentales ($5,9 \pm 5,6$) que en los recuperados al inicio de las pruebas *in vivo* ($1,0 \pm 1,5$).

Para la cuantificación relativa de los niveles de expresión de la Gp-P 17 se observó una tendencia de aumento ($p: 0,09$) en los valores obtenidos para los *H. contortus* recuperados de los animales de final del ensayo experimental *in vivo*, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (inicio: $1,0 \pm 0,16$, fin: $1,8 \pm 0,8$).

Por otra parte, no se observaron cambios significativos ($p: 0,22$) en los niveles de expresión de la Gp-P 2 (inicio: $1,0 \pm 0,45$, fin: $4,4 \pm 5,8$).

En las Figuras 12, 13 y 14 se muestran los valores de expresión individuales obtenidos para las tres Gp-P estudiadas en los machos de *H. contortus* recuperados de los animales experimentales al inicio y al final del periodo experimental.

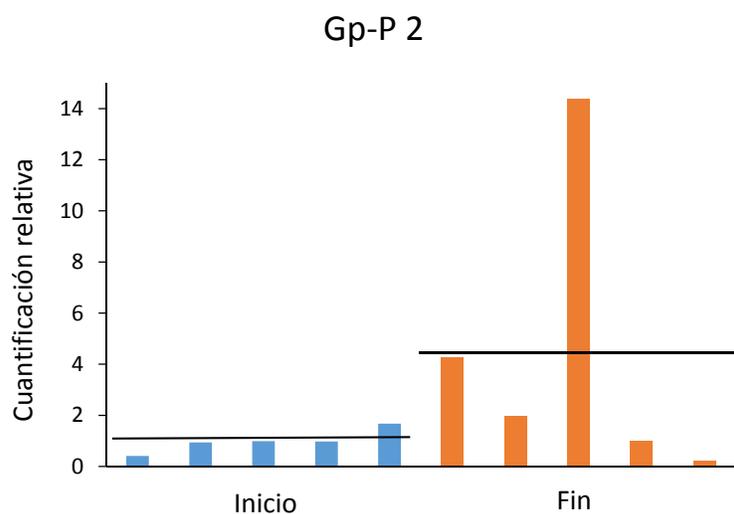


Figura 12: Expresión relativa de la Gp-P 2 en machos de *H. contortus* recuperados de los corderos del potrero experimental al inicio y al final de los ensayos *in vivo*. Cada barra representa un pool de 50 machos de *H. contortus*. La línea negra indica el promedio de las mediciones entre grupo.

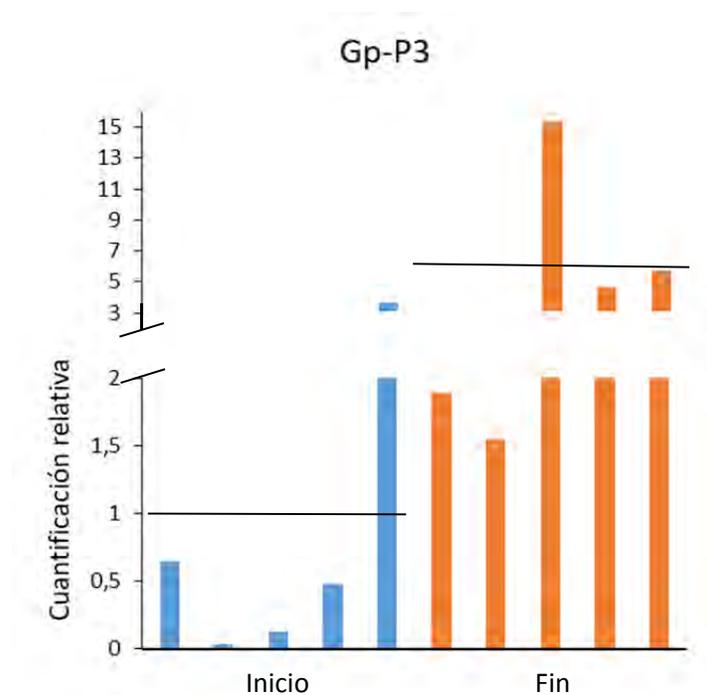


Figura 13: Expresión relativa de la Gp-P 3 en machos de *H. contortus* recuperados de los corderos del potrero experimental al inicio y al final de los ensayos *in vivo*. Cada barra representa un pool de 50 machos de *H. contortus*. La línea negra indica el promedio de las mediciones entre grupo.

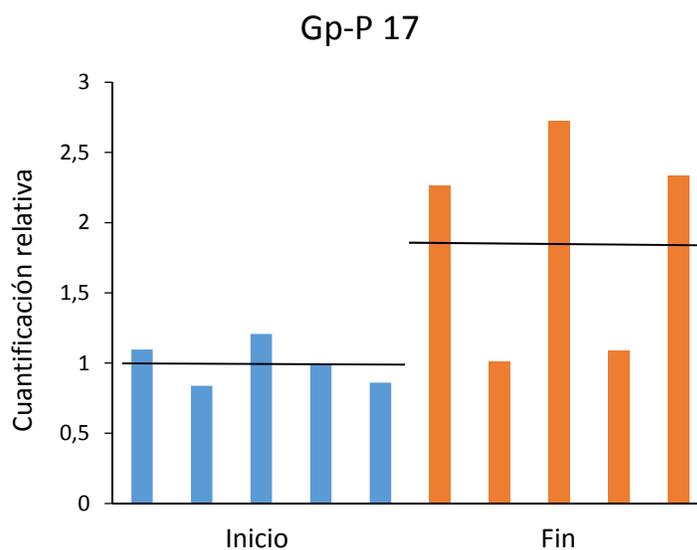


Figura 14: Expresión relativa de la Gp-P 17 en machos de *H. contortus* recuperados de los corderos del potrero experimental al inicio y al final de los ensayos *in vivo*. Cada barra

representa un pool de 50 machos de *H. contortus*. La línea negra indica el promedio de las mediciones entre grupo.

3. 2. 8 Principales aportes

Se resumen a continuación los principales aportes de esta sección experimental, los mismos se discuten en forma integral en la Discusión General (Capítulo IV) de la presente Tesis:

- Se cuantificó el nivel de expresión de tres Gp-P en *H. contortus* al inicio y luego de la exposición sostenida por 4 años de tratamiento con la combinación MOX y LEV.
- Se observó una tendencia al aumento de la expresión de las Gp-P estudiadas, siendo estadísticamente significativo el aumento de Gp-P 3 en los especímenes de *H. contortus* recuperados de los animales al final del periodo experimental, luego de 4 años de exposición sostenida a la combinación de los fármacos bajo estudio.
- Se evidenció una importante variabilidad en los niveles de expresión de los genes que codifican para estas proteínas en los parásitos, particularmente al final de los ensayos.
- Además de otros mecanismos específicos, la exposición de los nematodos a diferentes fármacos antihelmínticos puede incrementar los niveles de proteínas de acción inespecíficas como las Gp-P que contribuyen en el fenómeno de resistencia

4. DISCUSIÓN GENERAL

El uso de antihelmínticos es el principal método de control de las parasitosis en todo el mundo. Sin embargo, estos deben considerarse como un recurso no renovable en la medida en que la resistencia antihelmíntica siga avanzando. La incorporación de nuevos fármacos antihelmínticos al mercado farmacéutico veterinario con mecanismos de acción diferentes a los existentes ha disminuido considerablemente. Para obtener un nuevo fármaco con la apropiada eficacia y seguridad, deben evaluarse cientos de candidatos en sistemas *in vitro* primero, animales de laboratorio después, y finalmente en el hospedador destinatario de su uso (Witty, 1999). Este proceso de búsqueda e investigación requiere inversiones millonarias y puede durar más de 10 años (Hennessy, 1997; Witty, 1999). Ante esta situación, adquiere gran relevancia el conocimiento de las propiedades farmacológicas y de los factores que puedan modificar su actividad en condiciones prácticas, con el objetivo de prolongar la vida útil de los antihelmínticos disponibles.

El uso combinado de fármacos para mejorar los resultados del tratamiento se ha evaluado en numerosas enfermedades. Esta herramienta fue utilizada inicialmente para mejorar el efecto terapéutico de los fármacos antitumorales (Fairley, 1971).

La combinación de dos o más fármacos antihelmínticos ha sido propuesta como una estrategia para abordar el creciente problema de la resistencia antihelmíntica (Leathwick *et al.*, 2009; Geary *et al.*, 2012; Lanusse *et al.*, 2018). Luego de la administración conjunta de dos o más moléculas, pueden ocurrir interacciones tanto clínicas como toxicológicas, en las cuales un fármaco puede ser capaz de incrementar o disminuir la exposición sistémica del otro (Liang, 2006). Estas potenciales interacciones farmacocinéticas deben ser evaluadas antes de recomendar su uso práctico.

Este trabajo de Tesis estuvo orientado a evaluar de forma integrada la relación farmacocinética-farmacodinámica del uso combinado de MOX y LEV por el transcurso de 4 años, sobre una población parasitaria con marcados antecedentes de resistencia antihelmíntica principalmente a IVM, pero también diagnosticada en una oportunidad previa al presente estudio para MOX, documentada por Lloberas *et al.* (2013). Por otra parte, se evaluaron metodologías *in vitro* que permitieron caracterizar el estatus de susceptibilidad de los parásitos frente a los fármacos individuales y a la combinación y se utilizaron herramientas de biología molecular para poder cuantificar los niveles relativos de expresión de la Gp-P, señalada como un mecanismo inespecífico de resistencia. A

continuación, se discuten los principales resultados obtenidos en las diferentes secciones experimentales.

Caracterización fármaco-parasitológica del tratamiento combinado de MOX y LEV en ovinos parasitados naturalmente con nematodos gastrointestinales resistentes (estudios in vivo)

En la actualidad existen formulaciones combinadas de fármacos antihelmínticos disponibles para el tratamiento de ovinos en Australia, Nueva Zelanda, Uruguay, como así también en Argentina. El fundamento para la utilización de dichas formulaciones se basa en una menor resistencia de los parásitos a los múltiples componentes (cada uno con diferente mecanismo de acción/resistencia) en comparación con el tratamiento con un único principio activo (Anderson *et al.* 1988; Barnes *et al.* 1995; Leathwick *et al.* 2009).

Desde este punto de vista, el uso simultáneo de fármacos pertenecientes a diferentes grupos químicos tendría diferentes finalidades: a) Complementar la eficacia de antihelmínticos frente a diferentes especies de nematodos (efecto cruzado entre especies); b) Complementar la eficacia frente a diferentes individuos de una misma especie de nematodos (efecto cruzado entre sub-poblaciones); c) Adición frente a un individuo resistente a ambos antihelmínticos (efecto sinérgico). Sin embargo, estos beneficios pueden no ser permanentes y desarrollarse resistencia múltiple por parte de un mismo nematodo (Castells y Del Pino, 2007) (citado en: Suarez, 2013).

En el presente trabajo, las concentraciones plasmáticas de MOX y LEV estuvieron dentro del rango de valores reportados previamente por otros autores tras su administración individual en corderos (Barber *et al.*, 2003; Molento *et al.*, 2004; Lespine *et al.*, 2004; Suarez *et al.*, 2014). La administración combinada de MOX y LEV no afectó las concentraciones plasmáticas de ninguno de los fármacos individuales, lo que sugiere una falta de interacción a nivel hospedador. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de una interacción a nivel de los parásitos, en la cual se podría haber alcanzado un sinergismo aditivo entre los fármacos administrados.

La combinación de fármacos nematodocidas es una estrategia válida para el control parasitario si la eficacia de cada componente incluido es cercana al 100% (Bartram *et al.*, 2012). En este sentido, si se logra eliminar la totalidad de los parásitos con un tratamiento antihelmíntico, no existirá presión de selección y no se desarrollará resistencia a causa de los tratamientos. Sin embargo, cuando pre-existe un nivel de resistencia a los fármacos incluidos en la formulación, su uso está bajo discusión (Suarez *et al.*, 2014; Lanusse *et al.*,

2014). La utilidad los tratamientos combinados bajo estas condiciones ha sido reportada en bovinos (Leathwick *et al.*, 2016; Canton *et al.*, 2017). Sin embargo, es difícil encontrar poblaciones parasitarias en establecimientos ovinos que sean susceptibles a dos o más antihelmínticos pertenecientes a diferentes grupos químicos.

En la presente Tesis, tanto MOX como LEV demostraron valores altos de reducción en la cuenta de huevos calculados mediante el TRCH al inicio del ensayo *in vivo* (99% MOX y 85% LEV). Asimismo, la administración conjunta de MOX y LEV evidenció valores altos de eficacia inicial (2014) sobre todas las especies parasitarias, evaluada por medio del TEC (Tabla 6).

A partir de este momento y durante 4 años, la eficacia del tratamiento combinado MOX+LEV se estimó por medio del TRCH. Los porcentajes de reducción obtenidos a lo largo de todos los años de trabajo mostraron algunas fluctuaciones. El menor valor (77%) fue registrado en el tercer año de ensayo. Para el resto de los años el límite inferior del intervalo del 95% de confianza estuvo por debajo del 90%. La eficacia calculada para cada género parasitario, mediante la identificación de L3 en los coprocultivos, evidenció valores por debajo del 95% para *H. contortus*, *Teladorsagia* spp. y *Trichostrongylus* spp. durante todo el periodo experimental (Tabla 4).

Cuando la eficacia del tratamiento combinado se evaluó por medio del TEC, tanto al inicio como al final del periodo experimental, no se apreciaron cambios para las especies *T. circumcincta* y *T. axei*. Sin embargo, en el caso de *H. contortus*, la eficacia aumentó de 84,3% a 100% y sobre *T. colubriformis* disminuyó de 97,4% a 58%. Una elevada eficacia sobre *H. contortus* fue mantenida en un escenario con resistencia significativa a las LM. Por lo tanto, el tratamiento combinado resultó efectivo en retrasar la aparición de resistencia aun cuando la población parasitaria en estudio presentaba numerosos registros de resistencia a IVM (Entrocasso *et al.*, 2008; Lifschitz *et al.*, 2010; Lloberas *et al.*, 2012; 2013; 2015).

Durante el transcurso del estudio *in vivo* el desarrollo de resistencia antihelmíntica al tratamiento combinado fue diferente según la especie parasitaria evaluada. Estudios previos (Le Jambre *et al.*, 1999) muestran mayores valores de eficacia para MOX frente a *H. contortus*, comparado con *T. colubriformis*. Además, los resultados obtenidos también podrían estar influenciados por la vía de administración seleccionada para el tratamiento. Se utilizó una formulación de MOX inyectable dado que la formulación de administración

oral no se encuentra disponible en mercado farmacéutico de nuestro país. Estudios previos realizados por Lloberas *et al.* (2012) demostraron que luego de la administración intra-ruminal de LM, se obtienen mayores concentraciones de fármaco tanto en el contenido gastrointestinal como dentro de los parásitos. Esta mayor exposición al fármaco luego del tratamiento oral/intra-ruminal representó un aumento en la eficacia de las LM en ovinos (Gopal *et al.*, 2001, Lloberas *et al.*, 2012) y bovinos (Leathwick *et al.*, 2013, Canton *et al.*, 2018), dependiendo del estado inicial de resistencia antihelmíntica. Mientras que tras el tratamiento oral con MOX la eficacia fue del 100 % en ovinos infectados con *T. colubriformis*, la administración subcutánea mostro 0 % de reducción en la cuenta de huevos (Gopal *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral sugieren que la resistencia a MOX se retardó para el nematodo *H. contortus*, mientras que, por el contrario, se aceleró el proceso para *T. colubriformis*, incluso luego del tratamiento combinado. Desafortunadamente, por restricciones de bioética y de bienestar animal no pudimos realizar el TEC para los fármacos administrados de manera individual, en consecuencia, esta hipótesis no pudo ser confirmada y constituye una limitación del presente trabajo.

En general, las evidencias obtenidas en esta Tesis indican que, bajo las condiciones de trabajo descritas, el tratamiento combinado mantuvo buenos niveles de eficacia durante los 4 años del periodo experimental. Por su parte, Leathwick *et al.* (2012) demostraron efectos positivos para el tratamiento combinado de IVM y LEV a largo plazo en corderos. En dicho trabajo, el tratamiento combinado obtuvo un mayor porcentaje de reducción de la cuenta de huevos en relación al tratamiento individual con IVM. Con lo cual, la selección por resistencia en la población parasitaria fue mayor luego del tratamiento con IVM de manera individual que luego de la administración del tratamiento combinado con LEV.

Asimismo, los autores corroboraron el impacto de la población parasitaria en refugio sobre el desempeño de la combinación. En los establecimientos dónde el 10% de los corderos permaneció sin tratamiento los porcentajes de reducción de huevos fueron mayores que en aquellos en los cuales se trató a todos los animales (Leathwick *et al.*, 2012).

La condición de pastoreo del presente trabajo de Tesis estuvo caracterizada por baja carga animal y, en consecuencia, bajo nivel de infestividad de la pastura (L3/Kg de pasto seco). Esta condición debió seleccionarse dado que el potrero experimental poseía una pastura degradada y de baja calidad forrajera, por lo que la carga animal utilizada (3,33-

4,33 corderos/ha) resultó menor a la carga animal normalmente utilizada en la región de estudio (9 a 11 corderos/ha). Esta baja carga animal se seleccionó con el objetivo de asegurar una mínima ganancia de peso en los animales. Sin embargo, la baja contaminación de la pastura determinó que los corderos requieran menos tratamientos antihelmínticos que los esperados, siendo este factor uno de los principales factores para el desarrollo de resistencia antihelmíntica (Wolstenholme *et al.*, 2004).

En consecuencia, bajo las condiciones de trabajo descritas, la baja presión de selección ejercida con el tratamiento MOX+LEV sobre la población parasitaria contribuyó al buen desempeño del tratamiento durante los 4 años de duración del experimento. Sin embargo, la baja contaminación de la pastura determinó una menor población parasitaria en refugio, la cual se asocia a la mayor velocidad en el desarrollo de resistencia (Hodgkinson *et al.*, 2019). Por lo tanto, las condiciones experimentales de nuestro estudio estuvieron caracterizadas por un bajo número de tratamientos (retardando el desarrollo de resistencia) y bajo refugio (acelerando el desarrollo de resistencia). Este último punto pudo haber tenido un impacto negativo en la eficacia sobre, por ejemplo, *T. colubriformis*. Los resultados sugieren que luego de 4 años de uso del tratamiento combinado se estableció en el potrero experimental una población bi-resistente de *T. colubriformis* (resistente a MOX y LEV en forma combinada).

Este hecho también se observó cuando se evaluaron las eficacias individuales de los tratamientos con MOX y LEV mediante el TRCH, tanto al inicio como al final del periodo experimental. Luego de la administración individual de MOX la eficacia estimada por TRCH sobre *Trichostrongylus* spp. disminuyó de 99% (2014) a 30% (2018). Un resultado similar fue observado para el tratamiento con LEV, donde el porcentaje de reducción de la cuenta de huevos fue de 56 % al inicio (2014) y cayó drásticamente a 0 % en el 2018. Estos valores de eficacia inicial para los tratamientos individuales fueron calculados en base al porcentaje de larvas recuperadas del coprocultivo, donde sólo es posible identificar a nivel de género parasitario, por lo tanto, la presencia de múltiples especies dentro del género podría confundir el resultado y contribuir a la variabilidad observada a lo largo del periodo experimental.

El uso combinado de MOX y LEV no evidenció ninguna interacción farmacocinética adversa. Además, dado que las respuestas terapéuticas fueron favorables (TRCH) a lo largo del tiempo, el uso combinado de MOX y LEV, cuando la eficacia inicial es alta, sería

una estrategia válida para el control de nematodos gastrointestinales y particularmente para *H. contortus*. Sin embargo, es indispensable que esta herramienta sea acompañada con medidas de manejo que minimicen la necesidad de realizar tratamientos antihelmínticos, reduciendo así la presión de selección (por ejemplo, garantizando una proporción de población parasitaria en “refugio”). De otra manera, el desarrollo de resistencia múltiple será inevitable.

“Caracterización fenotípica y cuantificación de la expresión de Gp-P en la población parasitaria sometida a presión de selección con la combinación MOX+LEV (estudios *in vitro*)”

El monitoreo del nivel de resistencia adquiere vital importancia teniendo en cuenta que cuando se detecta una falla terapéutica en los sistemas productivos, a menudo, es demasiado tarde para prevenir el avance de la resistencia (Demeler *et al.*, 2010^b). El desarrollo de técnicas moleculares para detectar marcadores de resistencia a campo en forma masiva todavía no se encuentra disponible a pesar de diferentes avances ocurridos en este sentido para algunos grupos de fármacos (Barrère *et al.*, 2013).

Para esto, en los últimos años, se han evaluado diferentes pruebas *in vitro* que ofrecen la posibilidad de detectar la resistencia aun cuando su porcentaje en la población parasitaria es inferior al 25% (Martin *et al.*, 1989). Aunque algunos de estos métodos se han propuesto como una herramienta útil para el diagnóstico temprano de resistencia (Taylor *et al.*, 2002, Coles *et al.*, 2006), existen importantes dificultades en el desarrollo de estas metodologías y en la interpretación de la información surgida de las mismas. Estas están relacionadas a la sensibilidad de la prueba, el rango de concentraciones a utilizar, la solubilidad de las drogas y, principalmente, al hecho de que no se hayan podido correlacionar los resultados con los obtenidos en las pruebas *in vivo*. Es por este motivo que la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP) sólo aprueba para su uso diagnóstico el TEH para detectar resistencia al grupo de los BZD (Coles *et al.*, 2006).

En este trabajo de Tesis se seleccionó como prueba de diagnóstico *in vitro* el test de inhibición de la migración larval (TIML) ya que permite caracterizar los niveles de resistencia tanto a MOX como a LEV. Este test, a diferencia de otros, tiene la ventaja de poder cuantificar el efecto sobre la motilidad larvaria de forma objetiva a través del conteo de larvas que son capaces de migrar activamente a través de una malla, a diferencia de

otras pruebas de motilidad que realizan esta comparación por observación visual directa lo que introduce un grado de subjetividad a la medición (Kotze *et al.*, 2006). Asimismo, el hecho de trabajar con larvas de estadio 3, las cuales son relativamente fáciles de obtener a partir de coprocultivos y pueden conservarse refrigeradas hasta su utilización, permitió caracterizar los aislamientos provenientes de los ensayos *in vivo*.

Como una ventaja adicional, esta técnica permitió evaluar los efectos de la incubación conjunta de MOX y LEV sobre las poblaciones parasitarias, independizando la respuesta al tratamiento de los posibles efectos moduladores del hospedador. Sin embargo, existió una limitación en esta prueba al no poder contar con aislamientos parasitarios monoespecíficos que supone una logística de animales dadores en corrales separados. La falta de aislamientos monoespecíficos en las pruebas *in vitro* puede limitar la interpretación de los resultados y sus comparaciones estadísticas

El objetivo principal de esta prueba fue caracterizar las poblaciones parasitarias de inicio y fin del periodo experimental *in vivo* (sometida a presión de selección) frente a MOX y LEV incubados de manera individual o combinada.

El método debió evaluarse y adaptarse a las condiciones de trabajo particulares de esta Tesis. Al trabajar con aislamientos de géneros parasitarios mixtos fue necesario incluir un paso previo para verificar la migración de todos los géneros parasitarios en un porcentaje mayor al 90% (90-94,9%). Al igual que lo descrito por Demeler *et al.* (2010^a), el tamaño de malla de 25 μm resultó apropiado para permitir la migración de las larvas de parásitos gastrointestinales de ovinos.

Basados en las observaciones de este trabajo, el TIML fue efectivo para detectar la menor respuesta a MOX y a LEV cuando los aislamientos parasitarios fueron enfrentados a concentraciones crecientes de los fármacos incubados de manera individual. Sin embargo, la elevada variabilidad observada en algunas ocasiones junto a la dificultad en reproducir resultados similares a los obtenidos por otros autores, hace que la utilización del test para el diagnóstico práctico y masivo de resistencia utilizando poblaciones de campo sea muy difícil.

Para MOX se observó un aumento significativo de las DI 50 y DI 90 en el aislamiento mixto final respecto a los valores obtenidos para el aislamiento inicial y para el aislamiento de *H. contortus* susceptible. El incremento de la concentración inhibitoria 50 entre el aislamiento de inicial y el final fue del doble (Mixta inicial DI 50: 7,68 ng/ml; Mixta final DI 50: 16,28 ng/ml), mientras que para lograr la inhibición en la migración del 90% de las larvas del aislamiento final se requieren concentraciones 5 veces mayores con respecto al aislamiento inicial (Mixta inicial DI 90: 16,9 ng/ml; Mixta final DI 90: 83,3

ng/ml). Estos resultados son coincidentes con lo obtenido mediante el TRCH, al inicio del periodo experimental luego del tratamiento con MOX (0,2 mg/kg) se obtuvo un porcentaje de reducción en la cuenta de huevos de 99%, mientras que al finalizar el ensayo *in vivo* el mismo fue de tan solo 42%.

En el caso de LEV se observó una disminución en la respuesta inhibitoria de los aislamientos mixtos con respecto al aislamiento de *H. contortus* susceptible, sin embargo, al igual que lo obtenido en el ensayo *in vivo* estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Resulta interesante poder realizar una comparación farmacocinética-farmacodinámica entre los datos obtenidos para estos fármacos en estudios *in vivo* y lo observado en la prueba *in vitro* de inhibición de la migración larval. Para el caso de MOX, las máximas concentraciones en el tracto gastrointestinal de ovinos y bovinos (abomaso/intestino delgado) se alcanzan en el día 1 y se encuentran en un rango entre 50 y 180 ng/ml dependiendo de la vía de administración y el fluido-tejido analizado. A partir del día 2 las concentraciones descienden a menos de la mitad dada la elevada distribución de este fármaco hacia los tejidos particularmente hacia la grasa (Lifschitz *et al.*, 1999^b; Lloberas *et al.*, 2013). Si se comparan estas concentraciones con los valores de DI 90 del aislamiento mixto inicial de 16,9 ng/ml puede observarse que estas concentraciones serían suficientes para alcanzar una buena eficacia. Sin embargo, al analizar en este contexto el valor de la DI 90 del aislamiento final ya muestra un corrimiento importante de la curva dosis-respuesta hacia la derecha y las concentraciones alcanzadas *in vivo* en los sitios de localización parasitaria no serían suficientes para poder mantener una eficacia adecuada.

Para el caso de LEV resulta más complicado realizar esta comparación dado que no se encuentran datos reportados en detalle de su cinética en el tracto gastrointestinal de los rumiantes. Sin embargo, pueden utilizarse los datos en plasma siguiendo el concepto farmacológico que tras una administración parenteral los tejidos reflejan lo observado en la circulación sistémica (Lifschitz *et al.*, 2017). En este trabajo de tesis las DI 90 para LEV estuvieron alrededor de 2 µg/ml tanto para el aislamiento inicial como para el final. Teniendo en cuenta que el pico de LEV se alcanzó a la hora post-administración y que rápidamente sus concentraciones descendieron alcanzando niveles en plasma de 0,25 µg/ml a las 4 horas postratamiento, resulta muy difícil alcanzar *in vivo* las concentraciones inhibitorias necesarias para mantener una eficacia adecuada cuando la susceptibilidad de los parásitos presentes comienza a disminuir.

Cuando la prueba fue realizada con la incubación conjunta de MOX y LEV los aislamientos parasitarios evaluados no evidenciaron un comportamiento dependiente de la dosis. Se evidenció un aumento del efecto observado *in vitro* sobre la migración larval con respecto a las incubaciones individuales, ya que las concentraciones menores utilizadas (9 ng/ml de MOX y 0,03 µg/ml de LEV) fueron eficaces para inhibir la migración larval en un porcentaje superior al 80%. Este resultado es coincidente con los datos de eficacia obtenidos en los ensayos *in vivo* tanto mediante TRCH como mediante TEC. En el caso del TRCH, al inicio del periodo experimental se observó una reducción en el conteo de huevos post tratamiento del 100% cuando se administraron los fármacos de manera combinada a las dosis terapéuticas y para el TEC se obtuvieron eficacias de 84,3%, 100%, 100% y 97,4 % sobre *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei* y *Trichostrongylus colubriformis*, respectivamente.

En este sentido, existen reportes de aislamientos de *H. contortus*, *T. colubriformis* y *T. circumcincta* resistentes a IVM *in vivo* que fueron aún más resistentes a la inhibición del desarrollo y la migración de L3 *in vitro* (Gill *et al.*, 1991; 1995; Giordano *et al.*, 1988; Lacey *et al.*, 1990; Taylor, 1990; Hubert y Kerboeuf, 1992).

Así como con la inhibición obtenida para las concentraciones de los fármacos incubados de manera conjunta no fue posible estimar los valores de DI50, del mismo modo tampoco fue posible calcular índices de sinergismo/antagonismo comparando los valores con los obtenidos para las incubaciones individuales. Deberían haberse evaluado concentraciones menores a las testeadas para lograr ajustar una curva dosis-respuesta y poder utilizar el test para un potencial diagnóstico de resistencia en situaciones de uso de tratamientos combinados. A pesar de esto, queda claramente demostrado que cuando los parásitos son expuestos *in vitro* a la combinación MOX+LEV a las mismas concentraciones que para las incubaciones individuales, la respuesta (medida como inhibición de la migración larval) se incrementa.

Como consecuencia de las limitaciones que existen para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica por los métodos tradicionales, en relación a su sensibilidad, especificidad y laboriosidad, las técnicas moleculares de diagnóstico han sido propuestas como métodos complementarios. Sin embargo, dado que los mecanismos específicos de resistencia a las LM e imidazotiazoles aún no se conocen en toda su dimensión, incluir las técnicas

moleculares en la rutina diagnóstica de la resistencia no es factible. A esto se suman los elevados costos que dichas técnicas presentan en equipamiento e insumos.

Aunque la resistencia a las LM y al LEV parece ser multigénica (Prichard *et al.* 2007; McCavera *et al.*, 2007; Sangster *et al.*, 1991), la concentración final del fármaco en el parásito es determinante para definir su eficacia. Aumentar esa concentración y el tiempo de contacto fármaco-parásito es un importante desafío y se podría alcanzar mediante la manipulación del comportamiento farmacocinético del principio activo (absorción, distribución, metabolismo y eliminación), tanto en el hospedador como en el parásito.

Las moléculas centrales de todo este proceso son los transportadores celulares de membrana de tipo ABC tanto en el hospedador como en el parásito (Prichard, 2007; Lespine *et al.*, 2008). La Gp-P es una proteína transportadora de membrana asociada al fenómeno de resistencia a múltiples drogas (MDR). Si bien la Gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples drogas anticancerígenas, también se localiza en células normales de tejidos involucrados en los procesos de absorción, distribución, y excreción de fármacos (Mealey, 2004). La localización específica en estos tejidos sugiere que la Gp-P cumpliría un importante rol en la regulación del transporte de fármacos, modificando de este modo el comportamiento cinético y la biodisponibilidad de los mismos. La Gp-P funciona como una bomba de eflujo que secreta en forma activa una gran cantidad de compuestos no relacionados, desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. A nivel intestinal, la Gp-P limita la absorción y difusión transepitelial provocando modificaciones en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral (Lin, 2003; Ballent *et al.*, 2005).

En relación con los mamíferos, en los nematodos se ha descrito una mayor diversidad de transportadores del tipo ABC. Estudios realizados en el genoma del parásito modelo *Caenorhabditis elegans* identificaron al menos 15 genes que codifican para Gp-P (Ardelli y Prichard, 2013). La familia génica de las Gp-P parece ser moderadamente bien conservada entre *C. elegans* y los nematodos de rumiantes y por lo tanto es probable que también existan múltiples genes que codifiquen para Gp-P (Lespine *et al.*, 2008). De hecho, se han encontrado 9 genes que codifican para la Gp-P en *H. contortus* con un alto grado de identidad con las secuencias de genes en *C. elegans* (Williamson y Wolstenholme 2012).

La diversidad de las Gp-P de los nematodos sugieren que estas juegan un importante rol protector frente a un amplio rango de xenobióticos y metabolitos endógenos (Prichard y Roulet, 2007). De hecho, existe una importante evidencia acerca de la relación entre el

eflujo por Gp-P y la resistencia de los nematodos a los principales grupos de antihelmínticos, particularmente más evidente para las lactonas macrocíclicas (Ardelli y Prichard, 2004; Blackhall *et al.*, 1998; De Graef *et al.*, 2013).

En 1998 fue demostrado por primera vez que aislamientos de *H. contortus* resistentes a IVM mostraron niveles 3,4 veces mayores de Gp-P A (ortólogo de Gp-P 2) comparada con el aislamiento sin tratamiento (Xu *et al.*, 1998).

Mientras que la mayoría de los estudios se centran en la exposición *in vitro* sobre las L3 a una amplia variedad de antihelmínticos, existe información limitada sobre la potencial asociación entre la exposición del fármaco y los niveles de expresión de las Gp-P en especímenes adultos luego del tratamiento antihelmíntico *in vivo* en condiciones de campo, y en particular con combinaciones de fármacos (Lloberas *et al.*, 2012; Prichard y Roulet, 2007).

El presente trabajo de Tesis evaluó mediante qPCR el nivel de transcripción de 3 Gp-P (Gp-P 2; Gp-P 3; Gp-P 17) en el aislamiento de *H. contortus* sometido a presión de selección por 4 años de tratamiento con la combinación MOX+LEV (*in vivo*) y se comparó la expresión de estos transportadores en especímenes de *H. contortus* no expuestos a la combinación (aislamiento inicial). En las condiciones de trabajo descritas, se observó una tendencia al aumento de la expresión de las Gp-P estudiadas, siendo estadísticamente significativo el aumento de Gp-P 3, en los especímenes de *H. contortus* recuperados de los animales al final del periodo experimental, luego de 4 años de exposición sostenida a la combinación de los fármacos bajo estudio.

En este sentido, existe una considerable evidencia sobre el hecho que los nematodos pueden regular los niveles de expresión tanto de Gp-P como de otros transportadores celulares del tipo ABC mediante mecanismos transcripcionales o post transcripcionales para contrarrestar los efectos tóxicos de los fármacos antihelmínticos (James y Davey, 2009; Lloberas *et al.*, 2013; Raza *et al.*, 2016^a).

Por otro lado, se evidenció una importante variabilidad en los niveles de expresión constitutivos de estas proteínas en los parásitos. En este sentido, existen reportes que demuestran que los genes transportadores de fármacos no muestran un patrón constante de regulación después de la exposición a los antihelmínticos. Tal es así, que algunos estudios han reportado un aumento en el nivel transcripcional de ciertas Gp-P luego de la exposición *in vivo* (Lloberas *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 1998) e *in vitro* (Raza *et al.*, 2016^a, 2016^b; Williamson *et al.*, 2011; Xu *et al.* 1998) a los antihelmínticos, mientras que otros

trabajos no evidenciaron cambios transcripcionales en los nematodos colectados de animales tratados con IVM (Alvarez *et al.*, 2015; Areskog *et al.*, 2013).

En las condiciones experimentales del presente trabajo, el perfil de transcripción cuantificado por qPCR, evidenció una tendencia de aumento para las tres Gp-P estudiadas en los ejemplares machos de *H. contortus* recuperados de animales tratados al final de periodo experimental en relación a los individuos no expuestos a la combinación MOX+LEV. Este aumento de expresión fue estadísticamente significativo para la Gp-P 3. La respuesta de este transportador ante la presencia de xenobióticos puede ser muy variada pudiendo aumentar la expresión de algunas proteínas y disminuir la de otras. Maté *et al.* (2018) reportaron una disminución en los niveles de expresión de la Gp-P 3 y Gp-P 9 tras el tratamiento con IVM en un aislamiento de *H. contortus* altamente resistente. En dicho trabajo se utilizó un aislamiento de *H. contortus* resistente a 10 veces la dosis terapéutica de IVM (Eficacia estimada por TRCH: 32,6%). Por otro lado, se evidenció el aumento de la expresión de Gp-P 2 en los especímenes recuperados de los animales tratados a diferentes tiempos post- administración. De hecho, esta glicoproteína fue la primera hallada y relacionada con la resistencia a IVM (Xu *et al.*, 1998). Años más tarde, estudios realizados por Lloberas *et al.* (2013) informaron que el tratamiento IVM aumentó significativamente la expresión de Gp-P 2 en *H. contortus* resistente colectados de corderos tratados.

Estudios en el nematodo de vida libre *C. elegans* observaron cómo la Gp-P 3 actúa en la protección contra las toxinas naturales (Broeks *et al.*, 1995). Además, la expresión de algunos genes de Gp-P (incluidos Gp-P 3 y Gp-P 9) en las células excretoras intestinales de *C. elegans*, sugieren un mecanismo adicional en la protección contra sustancias tóxicas (Ardelli y Prichard, 2013).

Aunque está demostrado que la afinidad de MOX por este transportador es significativamente menor que la observada para IVM (Lespine *et al.* 2007), tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* se han demostrado interacciones entre MOX y Gp-P (Lloberas, *et al.*, 2013; Bygarski *et al.*, 2014). Además, existen diferentes publicaciones que muestran la modulación de MOX con diferentes agentes inhibidores de la Gp-P. Luego de la co-administración de MOX con verapamilo, un inhibidor de la actividad de la Gp-P, se observó una disminución significativa en el conteo de *H. contortus* post tratamiento en relación al grupo control (Molento y Prichard. 1999). También Lifschitz *et al.* (2002) observaron aumentos de la biodisponibilidad de MOX en bovinos luego de su co-administración con loperamida. Por su parte, Dupuy *et al.* (2003) demostraron

incrementos de las concentraciones plasmáticas de MOX luego de su co-administración con quercetina en corderos.

La interacción de LEV con la Gp-P ha sido evaluada también en el parásito. Sin embargo, se sabe poco sobre la interacción específica de LEV con las Gp-P. James y Davey (2009) informaron cómo la resistencia a IVM generada por presión de selección en *C. elegans*, contribuyó al desarrollo de resistencia cruzada al LEV y derivó en un incremento significativo de los niveles de expresión de Gp-P. Este hecho sugirió que el incremento en la actividad del transportador en poblaciones parasitarias resistentes podría ser consecuencia de su capacidad de transportar tanto IVM como LEV.

Por su parte, Kerboeuf y Guégnard, (2011), demostraron que LEV es sustrato de la Gp-P de los nematodos evaluando la acumulación de un compuesto fluorescente, sustrato de Gp-P, al inhibirse su transporte por LEV en un aislamiento de *H. contortus* resistente.

Estudios realizados sobre poblaciones de *H. contortus* encontraron incrementos significativos en los niveles de expresión de Gp-P 1 y Gp-P 9 en larvas 3 de un aislamiento resistente comparado con un aislamiento susceptible a LEV (Sarai *et al.* 2013). Sin embargo, los autores concluyen que estos incrementos no fueron consistentes en todos los estadios de vida del parásito y podrían no estar relacionados exclusivamente con la resistencia al LEV, ya que el aislamiento resistente evaluado presenta la misma condición frente a las LM y a los BZD (Sarai *et al.*, 2013). En concordancia con este hallazgo, Raza *et al.* (2016^b) demostraron que los niveles de transcripción de Gp-P 1, Gp-P 9.1 y Gp-P 9.2 fueron significativamente mayores en las larvas de *H. contortus* resistentes comparado con el aislamiento susceptible.

En el presente trabajo de Tesis, los niveles de ARNm de Gp-P varían considerablemente entre diferentes muestras intra-grupo, especialmente para Gp-P 2 y Gp-P 3 en los especímenes del aislamiento final, de manera similar a los resultados reportados por Williamson y Wolstenholme (2012). Es probable que esta variabilidad nos impidiera encontrar cambios significativos en la expresión de Gp-P 2 y Gp-P 17 después de la exposición *in vivo* del parásito a la combinación MOX+LEV. Una variedad de estudios ha informado niveles extremadamente altos de diversidad genética dentro de poblaciones de *H. contortus*, siendo el tamaño de la misma un determinante importante de esta diversidad genética (Gilleard y Redman, 2016; Laing *et al.*, 2013; Otsen *et al.*, 2001; Redman *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2013; Troell *et al.*, 2006). Esta característica es la

que permite a las poblaciones de *H. contortus* adaptarse rápidamente a cambios climáticos, hospedadores y tratamientos (Emery *et al.*, 2016).

El incremento de la transcripción de las Gp-P evaluadas en este trabajo de Tesis, como en otras publicaciones, sugieren que estos transportadores juegan un importante rol en los mecanismos resistencia antihelmíntica. Sin embargo, la confirmación de tal asociación requiere de estudios comparativos con la expresión en aislamientos susceptibles como así también estudios de expresión en especímenes recuperados a distintos tiempos post administración.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis consistió en la evaluación fármaco-parasitológica de la administración combinada de MOX y LEV sobre una población de nematodos gastrointestinales resistentes a ivermectina y bencimidazoles. Del análisis de los resultados y para las condiciones descritas se concluye:

- No se observaron cambios significativos en la cinética de disposición de MOX y LEV luego de su co-administración en comparación con la administración individual.
- En general, a lo largo del período experimental se obtuvieron niveles aceptables de reducción en la cuenta de huevos (TRCH) para la administración combinada MOX+LEV, aunque se observaron oscilaciones en los valores de reducción e intervalos de confianza que podrían estar indicando el desarrollo de resistencia.
- En la etapa final del período experimental el porcentaje de reducción de la cuenta de huevos del tratamiento combinado fue mayor que el obtenido para cada fármaco de manera individual, lo que podría indicar un efecto aditivo entre MOX y LEV.
- En las condiciones de estudio descritas, la combinación MOX+LEV mostró buenos niveles de eficacia sobre las especies parasitarias de localización abomasal.
- Luego de cuatro años de uso de la combinación MOX+LEV como único tratamiento se observó el desarrollo de resistencia múltiple en *T. colubriformis*.
- El TIML fue efectivo para detectar la resistencia a MOX y a LEV cuando los aislamientos parasitarios fueron enfrentados a concentraciones crecientes de los fármacos incubados de manera individual.
- Para MOX se observó un aumento de la DI 50 en el aislamiento mixto final respecto del aislamiento inicial y a los valores obtenidos para *H. contortus*

susceptible, siendo estadísticamente significativo el aumento con respecto al aislamiento inicial.

- En el caso de LEV, la DI50 del aislamiento mixto final no mostró diferencias respecto a los aislamientos mixto inicial y susceptible de *H. contortus*.
- La combinación de fármacos (MOX y LEV) evidenció un aumento del efecto observado *in vitro* sobre la migración larval con respecto a las incubaciones individuales. Sin embargo, el hecho de no contar con aislamientos monoespecíficos impidió avanzar en análisis dirigidos a caracterizar las potenciales interacciones farmacodinámicas presentes.
- El tratamiento combinado de MOX y LEV indujo incrementos en los niveles de expresión de las tres Gp-P evaluadas en los especímenes de *H. contortus* recuperados al finalizar los ensayos *in vivo*, siendo estadísticamente significativo dicho incremento para la Gp-P 3.

Este trabajo es una contribución original sobre la evaluación del desempeño fármaco-parasitológico de una combinación de dos fármacos (MOX+LEV) con diferentes propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Dichos fármacos pueden ser utilizados como una estrategia de control de parásitos gastrointestinales en contexto de resistencia antihelmíntica, prolongando su vida útil.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALVAREZ, L.; LIFSCHITZ, A.; ENTROCASSO, C.; MANAZZA, J.; MOTTIER, L.; BORDA, B.; VIRKEL, G.; LANUSSE, C. 2008. Evaluation of the pharmacokinetic interaction between ivermectin and albendazole following their combined use in parasitized lambs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31: 230-239.
- ALVAREZ, L.; SUAREZ, G.; CEBALLOS, L.; MORENO, L.; CANTON, C.; LIFSCHITZ, A.; MATE, L.; BALLENT, M.; VIRKEL, G.; 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: 53–63.
- ÁLVAREZ SÁNCHEZ, M.; PÉREZ GARCÍA, J.; CRUZ ROJO, M.; ROJO-VÁZQUEZ, F. 2005. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Veterinary Parasitology*. 129 (3-4): 291-298.
- ANDERSON, N.; MARTIN, P.; JARRETT, R.; 1988. Mixtures of anthelmintics: a strategy against resistance. *Australian Veterinary Journal*, 65: 62–64.
- ANZIANI, O. 2013. Anthelmintic resistance in nematodes of herbivores hosts in Argentina. 2013. Proc. 24th Int. Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Perth, Australia. pp 669.
- ANZIANI, O.; FIEL, C. 2005. Resistencia de los nematodos gastrointestinales a los antihelmínticos: un problema emergente y relevante para la producción bovina nacional. En: Resistencia a los antiparasitarios internos en Argentina. FAO Producción y Sanidad Animal, pp. 40–49.
- ANZIANI, O.; MUCHIUT, S. 2014. Resistencia antihelmíntica múltiple (closantel, febendazole, ivermectina y levamisole) en *Haemonchus spp.* parasitando a ovinos en la provincia de Santa Fe. Ineficacia de una triple combinación de estas drogas para su control. *Revista de Medicina Veterinaria*, 95: 22-27.

- ARESKOG, M.; ENGSTRÖM, A.; TALLKVIST, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; HÖGLUND, J. 2013. PGP expression in *Cooperia oncophora* before and after ivermectin selection. *Parasitology Research*, 112: 3005–3012.
- ARDELLI, B.; PRICHARD, R. 2004. Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 98: 371–384.
- ARDELLI, B.; PRICHARD, R. 2013. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 191: 264-275.
- BALLENT M.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; LANUSSE, C. 2005. Implicancias fisiofarmacológicas de la glicoproteína P en animales domésticos. *Analecta Veterinaria*, 25 (2): 36-47.
- BARBER, S.; BOWLES, V.; LESPINE, A.; ALVINERIE, M. 2003. The comparative serum disposition kinetics of subcutaneous administration of doramectin, ivermectin and moxidectin in the Australian Merino sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26 (5): 343-348.
- BARGER, I. 1999. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *International Journal for Parasitology*, 29: 41-47.
- BARNES, E.; DOBSON, R.; BARGER, I. 1995. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today*, 11: 56–63.
- BARRÈRE, V.; BEECH, R.; CHARVET, C.; PRICHARD, R. 2014. Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 44: 235-241.
- BARRÈRE, V.; KELLER, K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; PRICHARD, R. 2013. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. *Parasitology International*, 62 (5): 464-470.

- BARTRAM, D.; LEATHWICK, D.; TAYLOR, M.; GEURDEN, T.; MAEDER, S. 2012. The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. *Veterinary Parasitology*, 186: 151-158.
- BLACKHALL, W.; POULIOT, J.; PRICHARD, R.; BEECH, R. 1998. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Experimental Parasitology*, 90 (1): 42-8.
- BOURGEOIS, B. 2005. Methods for assessing pharmacodynamic interactions. In: Majkowski, E. et al. (eds.) *Antiepileptic Drugs Combination Therapy and Interactions*. Cambridge University Press, pp. 193-207.
- BROEKS, A.; JANSSEN, H.W.; CALAFAT, J.; PLASTERK, R.H., 1995. A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. *EMBO Journal*, 14. 1858-1866.
- BYGARSKI, E.; PRICHARD, R.; ARDELLI, B. 2014. Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 4 (3):143-51.
- CANTON, C.; CEBALLOS, L.; DOMÍNGUEZ, P.; MORENO, L.; FIEL, C.; BERNAT, G.; FARÍAS, C.; LANUSSE, C.; ALVAREZ, L. 2017. Pharmaco-parasitological evaluation of the ricobendazole plus levamisol nematocidal combination in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41: 83-91.
- CANTON, C.; CANTON, L.; DOMÍNGUEZ, P.; MORENO, L.; LANUSSE, C.; ALVAREZ, L.; CEBALLOS, L. 2018. Field trial assessment of ivermectin pharmacokinetics and efficacy against susceptible and resistant nematode populations in cattle. *Veterinary Parasitology*, 256: 43-49.

CARACOSTANTOGOLO, J.; CASTAÑO, R.; CUTULLÉ, C.; CETRA, B.; LAMBERTI, R.; OLAECHEA, F.; RUIZ, M.; SCHAPIRO, J., MARTÍNEZ, M.; BALBIANI, G.; CASTRO, M. 2005. Evaluación de la resistencia a los antihelmínticos en rumiantes en Argentina. En: *Resistencia a los antiparasitarios internos en Argentina*. FAO, Producción y Sanidad Animal, pp 7-34.

COLES, G. 2005. Anthelmintic resistance-looking to the future: a UK perspective. *Research Veterinary Science*, 78 (2): 99-108.

COLES, G.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.; GEERTS, S.; KLEI, T.; TAYLOR, M.; WALLER, P. 1992. Word Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodos of vererinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44: 35-44.

COLES A.; JACKSON, F.; POMROY, W.; PRICHARD, R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G., SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.; VERCRUYSSSE, J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136: 167-185.

CRISTEL, S.; FIEL, C.; ANZIANI, O.; DESCARGA, C.; CETRÁ, B.; ROMERO, J.; FERNÁNDEZ, S.; ENTROCASSO, C.; LLOBERAS, M.; MEDUS, D.; 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: 25-28.

DE GRAEF, J.; DEMELER, J.; SKUCE, P.; MITREVA, M.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E.; GELDHOF, P. 2013 Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora* isolate following *in vivo* and *in vitro* exposure to macrocyclic lactones. *Parasitology*, 140(4): 499-508.

- DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; EL-ABDELLATI, A.; STAFFORDD, K.; RYDZIKE, A.; VARADY, M.; KENYONG, F.; COLES, G.; HÖGLUND, J.; JACKSON, F.; VERCRUYSSE, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. 2010^a. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology*, 174 (1–2): 58-64.
- DEMELER, J.; KÜTTLER, K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. 2010^b. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastrointestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*, 170: 61–70.
- DICKER, A.; NISBET, A.; SKUCE, P. 2011. Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology*, 41: 935-942.
- DOLINSKÁ M.; KÖNIGOVÁ, A., LETKOVÁ, V.; MOLNÁR, L.; VÁRADY, M. 2013. Detection of ivermectin resistance by a larval development test. Back to the past or a step forward? *Veterinary Parasitology*, 198 (1–2): 154-158.
- DUPUY, J.; LARRIEU, G.; SUTRA, J.; LESPINE, A.; ALVINERIE, M. 2003. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology*, 112. 337–347.
- EADY, S.; WOOLASTON, R.; MORTIMER, S.; LEWER, R.; RAADSMA, H.; SWAN, A.; PONZONI, R. 1996. Resistance to nematode parasites in Merino sheep: sources of genetic variation. *Crop and Pasture Science*, 47: 895-915.
- EDDI, C.; CARACOSTANTOGOLO, J.; PEÑA, M.; SCHAPIRO, J.; MARANGUNICH, I.; WALLER, P.; HANSEN, J. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites in sheep in southern Latin America: Argentina. *Veterinary Parasitology*, 62: 189-197.
- EMERY, D.; HUNT, P.; LE JAMBRE, L. 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal of Parasitology*, 46: 755–769.

- ENTROCASSO, C. 1988^a. Epidemiology and control of bovine Ostertagiasis in South America. *Veterinary Parasitology*, 27: 59-65.
- ENTROCASSO, C. 1988^b. Resistencia parasitaria al Oxfendazole en ovinos en un establecimiento en la provincia de Buenos Aires. Memorias del 6º Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, agosto 1988.
- ENTROCASSO, C.; ALVAREZ, L.; MANAZZA, J.; LIFSCHITZ, A.; BORDA, B.; VIRKEL, G.; MOTTIER, L.; LANUSSE, C. 2008. Clinical efficacy assessment of the albendazole-ivermectin combination in lambs parasitized with resistant nematodes. *Veterinary Parasitology*, 155(3-4):249-56.
- EVANS KS, WIT J, STEVENS L, HAHNEL SR, RODRIGUEZ B, PARK G.; ZAMANIAN, M.; BRADY, S.; CHAO, E.; INTROCASO, K.; TANNY, R.; ANDERSEN, R. 2021. Two novel loci underlie natural differences in *Caenorhabditis elegans* abamectin responses. *PLoS Pathogens* 17(3): e1009297. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009297>.
- FAIRLEY, G. 1971. Combination chemotherapy in malignant diseases. *J.R.Coll. Physicians Lond.* 5, 167-77.
- FIEL, C.; STEFFAN, P. 1994. Epidemiología de los nematodos gastrointestinales en la Pampa Húmeda. En: Nari, A.; Fiel, C. (eds.). Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay. Hemisferio Sur, Montevideo, UY. pp 67-94.
- GEARY, T.; HOSKING, B.; SKUCE, P.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; MAEDER, S.; HOLDSWORTH, P.; POMROY, W.; VERCRUYSSSE, 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: 306-316.
- GIBALDI, M.; PERRIER, D., 1982. *Pharmacokinetics*. 2nd. ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 45–109.

- GILL, J.; REDWIN, J.; VAN WYK, J.; LACEY, E. 1991. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *International Journal of Parasitology*, 21 (7): 771-76.
- GILL, J.; REDWIN, J.; VAN WYK, J.; LACEY, E. 1995. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* – effects of ivermectin resistance. *International Journal of Parasitology*, 25: 463–470.
- GILLEARD, J.; REDMAN, E. 2016. Genetic diversity and population structure of *Haemonchus contortus*. *Advances in Parasitology. Elsevier*, pp. 31–68.
- GIORDANO, D.J.; TRITSCHLER, J.P.; COLES, G.C. 1988. Selection of ivermectin-resistant *Trichostrongylus colubriformis* in lambs. *Veterinary Parasitology*, 30: 139-148.
- GIUDICI, C.; ENTROCASSO, C.; STEFFAN, P. 2013. Biología, fisiología e inmunidad de nematodos gastrointestinales y pulmonares. En: Fiel, C. y Nari, A. (eds). Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay. Hemisferio Sur, Montevideo, UY. pp 1-28.
- GOPAL, R.; WEST, D.; POMROY, W. 2001. The difference in efficacy of ivermectin oral, moxidectin oral and moxidectin injectable formulations against an ivermectin resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis*. *New Zealand Veterinary Journal*, 49: 133-137.
- HENNESSY, D. 1997. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*, 72 (3-4): 367-90.
- HODGKINSON, J.; KAPLAN, R.; KENYON, F.; MORGAN, E.; PARK, A.; PATERSON, S.; BABAYAN, S.; BEESLEY, N.; BRITTON, C.; CHAUDHRY, U.; DOYLE, S.; EZENWA, V.; FENTON, A.; HOWELL, S.; LAING, R.; MABLE, B.; MATTHEWS, L.; MCINTYRE, J.; MILNE, C.; MORRISON, T.; PRENTICE, J.; SARGISON, N.; WILLIAMS, D.; WOLSTENHOLME, A.; DEVANEY, E. 2019. Refugia and anthelmintic resistance: Concepts and challenges. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10: 51-57.

- HUBERT J.; KERBOEUF D. 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*,130: 442-446.
- ILLANES, F.; ROMERO, J.; NIÑO URIBE, A.; PRUZZO, C. 2018. Primer informe de Resistencia antihelmíntica a monepantel en ovinos de la provincia de Corrientes, Argentina. *Veterinaria Argentina*, 35 (368).
- JABBAR, A.; IQBAL, Z.; KERBOEUF, D.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M.; AFAQ, M. 2006. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Science*, 79: 2413–2431.
- JAMES, C.; DAVEY, M. 2009. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Parasitology*, 39: 213–220.
- KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.;GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.;WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MASER, P. 2008. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodos. *Nature*, 452(7184): 176-180.
- KAPLAN, R. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitology*, 20: 477–481.
- KERBOEUF, D.; GUÉGNARD, F. 2011. Anthelmintics are substrates and activators of nematode P glycoprotein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 2224-2232.
- KOTZE, A.; BAGNALL, N. 2006. RNA interference in *Haemonchus contortus*: Suppression of beta-tubulin gene expression in L3, L4 and adult worms *in vitro*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145 (1): 101-10.
- KOTZE A.; LE JAMBRE L.; O'GRADY J. 2006. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug

- screening with Trichostrongylidae parasites. *Veterinary Parasitology*, 137 (3-4): 294-305.
- KOTZE, A.; RUFFELLA, A.; KNOXB, M.; KELLY, G. 2014. Relative potency of macrocyclic lactones in *in vitro* assays with larvae of susceptible and drug-resistant Australian isolates of *Haemonchus contortus* and *H. placei*. *Veterinary Parasitology*, 203: 294-302.
- KYRIAZAKIS, I.; HOUDIJK, J. 2006. Immunonutrition: nutritional control of parasites. *Small Ruminant Research*, 62: 79-82.
- LACEY, E.; REDWIN, J.; GILL, J.; DEMARGHERITI, V.; WALLER, P. 1990. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. En: Boray, J.C.; et al.. (eds). *Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs*, MSD AGVET, Rahway, NJ, pp. 177-184.
- LAING, R.; KIKUCHI, T.; MARTINELLI, A.; TSAI, I.; BEECH, R.; REDMAN, E.; HOLROYD, N.; BARTLEY, D.; BEASLEY, H.; BRITTON, C.; CURRAN, D.; DEVANEY, E.; GILBERT, A.; HUNT, M.; JACKSON, F.; JOHNSTON, S.; KRYUKOV, I.; LI, K.; MORRISON, A.; REID, A.; SARGISON, N.; SAUNDERS, G.; WASMUTH, J.; WOLSTENHOLME, A.; BERRIMAN, M.; GILLEARD, J.; COTTON, J. 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology* 14, R88. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-8-r88>.
- LAING, R.; GILLAN, V.; DEVANEY, E. 2017. Ivermectin - Old Drug, New Tricks? *Trends in Parasitology*, 33: 463-472.
- LANUSSE, C.; ALVAREZ, L.; LIFSCHITZ, A. 2014. Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. *Veterinary Parasitology*, 204: 18-33
- LANUSSE, C.; CANTÓN, C.; VIRKEL, G.; ÁLVAREZ, C.; COSTA, L.; LIFSCHITZ, A. 2018. Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. *Trends in Parasitology*, 34: 664-682.

- LEATHWICK, D.; HOSKING, B.; BISSET, S.; 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: 181-192.
- LEATHWICK, D.; WAGHORN, T.; MILLER, C.; CANDY, P.; 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: 285-294.
- LEATHWICK, D.; MILLER C. 2013. Efficacy of oral, injectable and pour-on formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, 191: 293-300.
- LEATHWICK, D.; MILLER, C.; SAUERMAN, C.; CANDY, P.; GANESH, S.; FRASER, K.; 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: 85-92.
- LE JAMBRE, L. 1976. Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, 2:385–391.
- LE JAMBRE, L.; DOBSON, R.; LENANE, I.; BARNES, E. 1999. Selection for anthelmintic resistance by macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 29: 1101-1111.
- LESPINE, A.; SUTRA, J.; DUPUY, J.; ALVINERIE, M.; AUMONT, G. 2004. The influence of parasitism on the pharmacokinetics of moxidectin in lambs. *Parasitology Research*, 93: 121-126.
- LESPINE, A.; MARTIN, S.; DUPUY, J.; ROULET, A.; PINEAU, T.; ORLOWSKI, S.; ALVINERIE, M. 2007. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure–affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30 (1): 84-9.

- LESPINE, A.; ALVINERIE, M.; VERCRUYSSSE, J.; PRICHARD, R.; GELDHOF, P. 2008. ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 24 (7): 293-8.
- LESPINE, A.; MÉNEZ, C.; BOURGUINAT, C.; PRICHARD, R. 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2: 58-7.
- LIANG, X., 2006. Multidrug transporters and drug targets. *Current Drug Targets*, 7: 911-921.
- LIFSCHITZ, A. 2000. Cinética plasmática y distribución tisular de fármacos endectocidas en bovinos. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencia Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Centro de la Provincia de Buenos Aires. 192p.
- LIFSCHITZ, A.; ENTROCASSO, C.; ALVAREZ, L.; LLOBERAS, M.; BALLENT, M.; MANAZZA, J.; VIRKEL, G.; BORDA, B.; LANUSSE, C. 2010. Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, 172: 291-298.
- LIFSCHITZ, A.; LANUSSE, C.; ALVAREZ, L. 2017. Host pharmacokinetics and drug accumulation of anthelmintics within target helminth parasites of ruminants. *New Zealand Veterinary Journal*, 65(4):176-184.
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; PIS, A.; IMPERIALE, F.; SANCHEZ, S.; ALVAREZ, L.; KUJANEK, R.; LANUSSE, C. 1999^a. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Veterinary Parasitology*, 86: 203-215.
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; IMPERIALE, F.; SUTRA, J.; GALTIER, P.; LANUSSE, C.; ALVINERIE, M. 1999^b. Moxidectin in cattle: correlation between plasma and target tissues disposition. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22(4):266-73.

- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; SALLOVITZ, J., IMPERIALE, F., PIS, A., LANUSSE, C., 2002. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 25 (2): 111–20.
- LIN, J. 2003. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Advances in Drug Delivery Review*, 55 (1): 53-81.
- LITTLE, P.; HODGEA, A.; MAEDER, S.; WIRTHERLE, N.; NICHOLAS, D.; COX, G.; CONDER G. 2011. Efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Veterinary Parasitology*, 181: 180-193.
- LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25 (4): 402-8.
- LLOBERAS, M. 2018. Evaluación cinético-dinámica *in vivo* e *in vitro* en *Haemonchus contortus* resistente a lactonas macrocíclicas. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencia Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Centro de la Provincia de Buenos Aires. 190p.
- LLOBERAS, M.; ALVAREZ, L.; ENTROCASSO, C.; VIRKEL, G.; LANUSSE, C.; 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: 304-309.
- LLOBERAS, M.; ALVAREZ, L.; ENTROCASSO, C.; VIRKEL, G.; BALLENT, M.; MATE, L.; LANUSSE, C.; 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: 20-27.

- LLOBERAS, M.; ALVAREZ, L.; ENTROCASSO, C.; BALLENT, M.; VIRKEL, G.; LUQUE, S.; LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A. 2015. Comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic response of single and double intraruminal doses of ivermectin and moxidectin in nematode-infected lambs. *New Zealand Veterinary Journal*, 63: 227-234.
- LUQUE, S. 2019. Control de *Haemonchus contortus* multi-resistente: estudio de la interacción farmacológico entre ivermectina y fenbendazol. Tesis de Maestría en Sanidad Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata 87p.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Her Majesty's Stationery Office, London.160p.
- MARTIN, R. 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary Journal*, 154 (1): 11-34.
- MARTIN, P.; ANDERSON, N.; JARRETT, R. 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays. *Australian Veterinary Journal*, 66: 236–240.
- MATÉ, L.; BALLENT, M.; CANTÓN, C.; CEBALLOS, L.; LIFSCHITZ, A.; LANUSSE, C.; ALVAREZ, L.; LIRON, J. 2018. Assessment of P-glycoprotein gene expression in adult stage of *Haemonchus contortus* *in vivo* exposed to ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 264: 1-7.
- MCCAVERA, S.; WALSH, T.; WOLSTENHOLME, A. 2007. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. *Parasitology*, 134 (8): 1111-21.
- MCKENNA, P. 1996. Potential limitations of the undifferentiated faecal egg count reduction test for the detection of anthelmintic resistance in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 44: 73-75.

- MCKENNA, P. 1997. Use of arithmetic and geometric means in the calculation of anthelmintic efficacy. *Veterinary Record*, 141: 472-473.
- MCKENNA, P.; BADGER, S.; MCKINLEY, R.; TAYLOR, D. 1990. Simultaneous resistance to two or more broad-spectrum anthelmintics by gastrointestinal nematode parasites of sheep and goats. *New Zealand Veterinary Journal*, 38: 114–117
- MEALEY, K. 2004. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27 (5): 257-64.
- MIRÓ, M.; ROCHA E SILVA, C.; VIVIANI, P.; LUQUE, S.; LLOBERAS, M.; COSTA, L.; LANUSSE, C.; VIRKEL, G.; LIFSCHITZ, A. 2020. Combination of bioactive phytochemicals and synthetic anthelmintics: *In vivo* and *in vitro* assessment of the albendazole-thymol association. *Veterinary Parasitology*, 281: 109-121.
- MOLENTO, M.; PRICHARD, R. 1999. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitology Research*, 85 (12):1007-11.
- MOLENTO, M.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; LANUSSE, C.; PRICHARD, R. 2004. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitology Research*, 92: 121-127.
- MUCHIUT, S.; FERNÁNDEZ, A.; LLOBERAS, M.; STEFFAN, P.; LUQUE, S.; CARDOZO, P.; BERNAT, G.; RIVA, E.; FIEL, C. 2019. Recovery of fenbendazole efficacy on resistant *Haemonchus contortus* by management of parasite refugia and population replacement. *Veterinary Parasitology*, 271: 31-37.
- NARI, A.; FIEL, C. 2013. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. *Hemisferio Sur*. pp 1-59.

- NARI, A.; PETRACCIA, C.; CARDOZO, H. 1982. La inhibición del desarrollo larvario en nematodos gastrointestinales de ovinos con especial referencia a *Haemonchus contortus*. *Veterinaria*, 18 (81): 78-88.
- NEWTON, S.; MUNN, E. 1999. The Development of Vaccines against Gastrointestinal Nematode Parasites, Particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*, 15: 116-122.
- NIEC, R. 1968. Cultivo e identificación de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. INTA: Argentina. Manual técnico N° 3, 32 p.
- NJUE, A.; HAYASHI, J.; KINNE, L.; PENG FENG, X.; PRICHARD, R. 2004. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *Journal of Neurochemistry*, 89 (5): 1137-47.
- OTSEN, M.; HOEKSTRA, R.; PLAS, M.; BUNTJER, J.; LENSTRA, J.; ROOS, M. 2001. Amplified fragment length polymorphism analysis of genetic diversity of *Haemonchus contortus* during selection for drug resistance. *International Journal for Parasitology*, 31: 1138–1143.
- PARAUD, C.; PORS, I.; CHICARD, C.; CHARTIER, C. 2006. Comparative efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goat faeces: influence of the duration and of the temperature of coproculture. *Parasitology Research*, 98: 207-213.
- PRICHARD, R. 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*, 17 (9): 445-53.
- PRICHARD, R. 2007. Ivermectin resistance and overview of the consortium for anthelmintic resistance SNPs. Expert Opinion. *Drug Discovery*, 2 (1): 41-52.

- PRICHARD, R.; ROULET, A. 2007. ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, 134 (8): 1123-32.
- PRICHARD, R.; HALL, C.; KELLY, J.; MARTIN, I.; DONALD, A. 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, 56: 239-250.
- RAZA, A.; BAGNALL, N.; JABBAR, A.; KOPP, S.; KOTZE, A. 2016^a. Increased expression of ATP binding cassette transporter genes following exposure of *Haemonchus contortus* larvae to a high concentration of monepantel *in vitro*. *Parasitology Vectors*, 9: 522.
- RAZA, A.; KOPP, S.; BAGNALL, N.; JABBAR, A.; KOTZE, A. 2016^b. Effects of *in vitro* exposure to ivermectin and levamisole on the expression patterns of ABC transporters in *Haemonchus contortus* larvae. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6: 103–115.
- REDMAN, E.; PACKARD, E.; GRILLO, V.; SMITH, J.; JACKSON, F.; GILLEARD, J. 2008. Microsatellite analysis reveals marked genetic differentiation between *Haemonchus contortus* laboratory isolates and provides a rapid system of genetic fingerprinting. *International Journal of Parasitology*, 38: 111–122.
- ROBERTS, F.; O'SULLIVAN, P. 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1 (1): 99-103.
- ROMERO, J.; ESPINOSA, G.; VALERA, A. 1992. Demostración de la resistencia a oxfendazole en trichostrongylidos de ovinos de la zona deprimida del Salado. *Revista Ibérica de Parasitología*, 36:249-255.
- ROMERO, J.; SÁNCHEZ, R.; BOERO, C. 2007. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en la Pampa húmeda y la Mesopotamia. En: En Suárez, V.; Olaechea, F.; Romero, J; Rossanigo, C. (eds). Enfermedades parasitarias de los ovinos

y otros rumiantes menores en el cono sur de América. INTA. EEA Anguil La Pampa, Argentina, pp. 33-42.

SANGSTER, N.; DAVIS, C.; COLLINS, G. 1991. Effects of cholinergic drugs on longitudinal contraction in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 21(6): 689-95.

SANGSTER, N.; GILL, J. 1999. Pharmacology of Anthelmintic Resistance. *Parasitology Today*, 15 (4): 141-6.

SARAI, R.; KOPP, S.; COLEMAN, G.; KOTZE, A. 2013. Acetylcholine receptor subunit and P-glycoprotein transcription patterns in levamisole-susceptible and resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3: 51-58.

SARAI, R.; KOPP, S.; COLEMAN, G.; KOTZE, A. 2014. Drug-efflux and target-site gene expression patterns in *Haemonchus contortus* larvae able to survive increasing concentration of levamisol *in vitro*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4: 77-84.

SCHWARZ, E.; KORHONEN, P.; CAMPBELL, B.; YOUNG, N.; JEX, A.; JABBAR, A.; HALL, R.; MONDAL, A.; HOWE, A.; PELL, J. 2013. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. *Genome Biology*, 14: R89.

SHAH, V.; MIDHA, K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.; SKELLY, J.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.; COOK, C.E.; MCDOWALL, R. 1992. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81: 309-312.

SOULSBY, E. 1988. Nematodos En: Soulsby, E J L (ed.). *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. 7^o ed. Interamericana: México. pp 136-354.

- STEFFAN, P.; SÁNCHEZ, E.; ENTROCASSO, C.; FIEL, C.; LLOBERAS, M.; RIVA, E.; GUZMÁN, M. 2011. Eficacia de monepantel contra nematodos de ovinos con resistencia antihelmíntica múltiple en la Región Templada de Argentina. *Veterinaria Argentina*. 28 (273).
- SUAREZ, G. 2013. Valoración fármaco-parasitológica integrada de diferentes formulaciones nematocidas en el contexto de la resistencia antihelmíntica en ovinos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil, Argentina. 184 p.
- SUAREZ, G.; ALVAREZ, L.; CASTELLS, D.; MORENO, L.; FAGIOLINO, P.; LANUSSE, C. 2014. Evaluation of pharmacological interactions after administration of a levamisole, albendazole and ivermectin triple combination in lambs. *Veterinary Parasitology*, 201 (1-2):110-119
- SUÁREZ, V. 2007. Producción ovina e importancia de los nematodos gastrointestinales en la Argentina. En: Suárez, V. et al. (eds.) Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. INTA. EEA Anguil: La Pampa, Argentina pp.9-14.
- TAYLOR, M. 1990. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. *Research in Veterinary Science*, 49: 198–202.
- TAYLOR, M.; COOP, R.; WALL, R. 2016 *Veterinary parasitology*. 4th ed. New Delhi, India, Wiley Blackwell, pp.275-277.
- TAYLOR, M.; HUNT, K.; GOODYEAR, K. 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103: 183-194.
- TROELL, K.; ENGSTRÖM, A.; MORRISON, D.; MATTSSON, J.; HÖGLUND, J. 2006. Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants. *International Journal for Parasitology*, 36: 1305–1316.

- VON SAMSON-HIMMELSJERNA, G. 2006. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 136 (2): 99-107
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; COLES, C.; JACKSON, F.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.; CIRAK, V.; DEMELER, J.; DONNAN, A.; DORNY, P.; EPE, CH.; HARDER, A.; HÖGLUND, J.; KAMINSKY, R.; KERBOEUF, D.; KÜTTLER, U.; PAPADOPOULOS, E.; POSEDI, J.; SMALL, J.; VÁRADY, M.; VERCRUYSSSE, J., WIRTHERLE, N. 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research*, 105 (3): 825-34.
- WILLIAMSON S.M.; WOLSTENHOLME A.J. 2012. P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies. *Journal of Helminthology*, 86 (2): 202-8.
- WILLIAMSON, S.; MCCAVERA, S.; COLES, G.; WOLSTENHOLME, A. 2010. *Haemonchus contortus* putative ABC transporter mRNA, partial cds GenBank: HM635772.1 In: Investigating candidate resistance genes in an ivermectin-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. Recuperado de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM635772.1/#sequence_HM635772.1
- WILLIAMSON, S.; STOREY, B.; HOWELL, S.; HARPER, K.; KAPLAN, R.; WOLSTENHOME, A. 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 180 (2): 99-105.
- WITTY, M. 1999. Current strategies in the search for novel antiparasitic agents. *International Journal of Parasitology*, 29: 95-103.
- WOLSTENHOLME, A.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20: 469-476.

WOOD, I.; AMARAL, N.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.; KASSAI, T.; MALONE, J.; PANKAVICH, J.; REINECKE, R.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S.; VERCRUYSSSE, J. 1995. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) 2nd. of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 58: 181-213.

XU, M.; MOLENTO, M.; BLACKHALL, W.; RIBEIRO, P.; BEECH, R.; PRICHARD, R.; 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 91 (2): 327-35.