



**PROGRAMA DE INVESTIGACION EN FARMACOLOGIA VETERINARIA
-FARMACOLOGÍA DE DROGAS ANTIPARASITARIAS EN RUMIANTES-**

**Laboratorio de Farmacología Veterinaria,
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Centro de la Pcia. de Bs. As.**
Campus Universitario, 7000 Tandil, Argentina.
Tel.: 02293-439850 int. 224; 226; E-mail: clanusse@vet.unicen.edu.ar

Integrantes

Carlos Lanusse, MV, Dr.Cs.Vet., Ph.D., Dip ECVPT (Prof. Titular, Inv. Principal CONICET)
Sergio Sánchez Bruni, MV, Dr. Ciencia Animal (Prof. Asociado, Inv. Adjunto CONICET)
Luis Alvarez, MV, Dr. Ciencia Animal (Prof. Adjunto, Inv. Adjunto CONICET)
Adrián Lifschitz, Vet., Dr. Ciencia Animal (Inv. Adjunto CONICET)
Guillermo Virkel, Vet., Dr. Ciencia Animal (Inv. Adjunto CONICET)
Fernanda Imperiale, Vet., Dr. Ciencia Animal (Inv. Adjunto CONICET)
Laura Moreno Torrejón, MV, Dr. en Veterinaria (Inv. Adjunto CONICET)
Juan Sallovitz, MV, Dr. Ciencia Animal (Profesional Adjunto CICPBA)
Laura Maté, Bqca., Dr. Cs. Biológicas (Inv. Asistente CONICET)
Mariana Ballent, Vet., Dr. Ciencia Animal (Becaria Post-Doctoral CONICET)
Laura Ceballos, Lic. Biología, Dr. Ciencia Animal (Becaria Post-Doctoral CONICET)
Mariana Bistoletti, Lic en Alimentos (Becaria Doctoral CONICET)
Cristina Farías, Fca., Bqca. (Personal Principal CONICET)
Gonzalo Suarez, MV, (Doctorando, UdeLAR, Uruguay)
Alejandra Confalonieri, Vet. (Becaria Doctoral CONICET)
Lucía Urbizu, Fca. (Becaria Doctoral CONICET)
Sebastián Iezzi, Lic en Alimentos (Becario Doctoral CONICET)
Pablo Nejamkin, Ayudante Alumno (Becario Entrenamiento CICPBA)
Manuela Herrera, Ayudante Alumna
José Canevari, Ayudante Alumno
Candela Cantón, Ayudante Alumna
Adrián Perez, Personal Técnico
Walter Barbieri, Personal Técnico

Descripción. El Programa de Investigación **-FARMACOLOGÍA DE DROGAS ANTIPARASITARIAS EN RUMIANTES-** se desarrolla desde el año 1992 en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria, Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Basado en un abordaje interdisciplinario que acopla diferentes estrategias integradas de investigación básica y aplicada, el objetivo central del Programa científico es *profundizar en la comprensión de los aspectos farmacológicos que hacen a la más adecuada y eficiente utilización terapéutica de fármacos antiparasitarios en rumiantes, en busca de una optimización del tratamiento que evite/retarde la aparición de resistencia, que redunde en un menor costo de producción y, que permita un más certero conocimiento de los perfiles de residuos de droga en tejidos de animales tratados que van al consumo humano.* Modificaciones farmacocinéticas y metabólicas pueden afectar la concentración y/o período de tiempo en el que los parásitos están expuestos a droga activa y, por consecuencia la eficacia clínica de los tratamientos y el éxito de los programas de control antiparasitario. *La complementación de técnicas de base farmacológica con herramientas de biología molecular aplicadas a la comprensión de los fenómenos farmacocinéticos y metabólicos relacionados con la actividad antiparasitaria y desarrollo de resistencia, conforma el eje estratégico por el cual se abordan diferentes aspectos fármaco-parasitológicos críticos para optimizar el control antiparasitario en salud y producción animal.*

Historial. Logros. Aporte disciplinar.

El desarrollo de este Programa de Investigación llevó implícito una estrategia de formación de recursos humanos en el área disciplinar. La estrategia se basó en la preparación de recursos con una sólida formación integral en docencia e investigación. Tras haberse cumplido 18 años desde el inicio de las actividades del Laboratorio (1992), es valioso resaltar que la *formación de un equipo de*



investigación con una definida "identidad temática" (donde en la actualidad trabajan más de 20 personas estables entre docentes, investigadores, becarios, doctorandos, personal técnico, etc), que ha alcanzado una notable inserción internacional dentro de la Farmacología Veterinaria, es la contribución más significativa alcanzada. Lo que fue una apuesta inicial orientada al desarrollo de un Laboratorio de Farmacología Veterinaria en la FCV, UNCPBA, con especial énfasis en la formación de recursos humanos en el área específica, tuvo un resultado altamente satisfactorio tal como se desprende de la evolución global del grupo. La misma facilitó lograr en pocos años un reconocido liderazgo dentro de la "*Farmacología de las Drogas Antiparasitarias*", sustentado en el apoyo de la UNCPBA y de varias instituciones de ciencia y tecnología nacionales e internacionales que han aportado recursos a nuestros proyectos, todo lo cual nos permite hoy contar con personal altamente calificado y un laboratorio con la máxima capacidad técnico-metodológica para encarar los desafíos futuros.

Dentro de los aportes científicos específicos, se ha llevado a cabo una actividad complementaria en lo relacionado a la interacción con la industria farmacéutica con servicios de consultoría y actividades de desarrollo tecnológico en el área específica de nuestra especialidad dentro de la Farmacología. Una fructífera y equilibrada relación entre las actividades de investigación realizadas en nuestro laboratorio y la prestación de servicios y/o desarrollos tecnológicos para la industria farmacéutica, ha sido lograda.

Se ha generado información de base farmacológica que abarca desde aspectos moleculares básicos sobre la relación hospedador-fármaco-parásito, hasta la generación de investigación aplicada que permitió optimizar la utilización terapéutica de drogas antiparasitarias en rumiantes. La investigación desarrollada ha permitido dar un salto cualitativo de envergadura en la implementación de estudios fármaco-parasitológicos integradores, necesarios para la comprensión de aspectos moleculares cruciales que ayuden a lograr una optimización y uso sustentable del control químico del parasitismo en Producción Animal. Este enfoque farmacológico integral, además de novedoso y original tanto para la Farmacología Veterinaria como Humana, es crucial para la optimización del control antiparasitario frente al preocupante crecimiento del fenómeno de resistencia, elemento crítico para el control sustentable del parasitismo en el futuro inmediato.

Dentro de la línea específica de investigación, las *contribuciones originales emergentes del trabajo del grupo*, se pueden resumir como sigue:

- 1) *Caracterización del comportamiento farmacocinético y distribución gastrointestinal de fármacos antihelmínticos benzimidazoles (BZD) y sus metabolitos en rumiantes. Identificación de una serie de factores (ayuno, tipo de dieta, estado nutricional, interacciones medicamentosas, enfermedad parasitaria, etc.) que modifican la cinética y eficacia de éstos fármacos bajo condiciones productivas.*
- 2) *Caracterización in vivo e in vitro de los procesos de biotransformación hepática y extrahepática (gastrointestinal, pulmonar, etc.) para fármacos antihelmínticos BZD, incluyendo la identificación de los sistemas enzimáticos involucrados. Valoración del impacto de la modulación del metabolismo microsomal hepático sobre la biodisponibilidad de droga/metabolitos activos y eficacia antiparasitaria.*
- 3) *Identificación del comportamiento enantiomérico de los derivados BZD sulfóxidos. Caracterización original de las proporciones enantioméricas en tejidos de animales tratados y en diferentes parásitos blanco, con descripción del proceso de inversión quiral a nivel ruminal.*
- 4) *Demostración de los mecanismos involucrados en la difusión/penetración de drogas madres y/o metabolitos en diferentes parásitos helmintos y de la capacidad diferencial de los mismos para metabolizar fármacos antihelmínticos BZD. Descripción de las modificaciones en el eflujo (transporte celular) y metabolismo oxidativo en Fasciola hepática resistente a triclabendazole.*
- 5) *Caracterización comparativa de la cinética de disposición plasmática y de los procesos de distribución de avermectinas y milbemicinas a tejidos de localización parasitaria en bovinos. Contribución a la comprensión de la relación entre farmacocinética y persistencia de actividad antiparasitaria para estas moléculas en rumiantes.*



6). *Aportes en la descripción del rol de los sistemas transportadores proteicos (P-gp) en la secreción intestinal de avermectinas y milbemicinas. Caracterización del proceso de eflujo celular de estos fármacos in vitro. Modulación del eflujo celular de droga in vivo e impacto en la eficacia sobre nematodos resistentes.*

7) *Caracterización in vitro e in vivo del proceso de absorción percutánea de lactonas macrocíclicas en piel bovina. Identificación de factores que afectan la absorción de estos fármacos administrados por vía tópica en bovinos.*

Se presentan a continuación algunas de las publicaciones más representativas del aporte disciplinar realizado en función de la temática y repercusión alcanzada (citaciones):

- Lanusse, C.; Lifschitz, A., Virkel, G. Sánchez, S.; Alvarez, L.; Sutra, J.F. Galtier, P.; Alvinerie, M. (1997). Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20: 91-99.

- Alvarez, L.; Imperiale, F.; Sánchez, S.; Murno, G.; Lanusse, C. (2000). Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *H. contortus* and *F. hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 94: 75-89.

- Sánchez, S.; Alvarez, L.; Sallovitz, J.; Lanusse, C. (2000). Enhanced plasma and target tissues availabilities of albendazole and its metabolites in fasted calves: evaluation of different fasting intervals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23 (4): 193-201.

- Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J.; Galtier, P.; Alvinerie, M.; Lanusse, C. (2000). Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. *Veterinary Parasitology*, 87, 327-338.

- Moreno L., Echevarría F., Muñoz, F., Alvarez, L., Sanchez, S. ; Lanusse C. (2004). Dose-dependent activity of albendazole against benzimidazole-resistant nematodes in sheep: relationship between pharmacokinetics and efficacy. *Experimental Parasitology*, 106:150-157

- Ballent M, Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C.. (2006). Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: *in vitro* and *in vivo* assessments. *Drug Metabolism and Disposition*, 34:457-463

-Alvarez, L. Solana H., Mottier L., Virkel, G., Fairweather, I., Lanusse, C. (2005). Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitology*, 131: 501-510.

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

- Mottier L, Alvarez L, Fairweather, I, Lanusse C. (2007). Resistance induced changes on triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *Journal of Parasitology*, 92:1355-1360

- Alvarez L, Mottier L, Lanusse C.(2007). Drug transfer into target helminth parasites. *Trends in Parasitology*, 23: 97-104.

- Lifschitz A, Suarez VH, Sallovitz J, Cristel SL, Imperiale F, Ahoussou S, Schiavi C, Lanusse C. (2010). Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: Comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. *Experimental Parasitology*, PMID: 20109455, en prensa.

Vínculos con otros centros. La colaboración con diferentes laboratorios/centros/instituciones ha permitido llevar adelante en forma multidisciplinar una buena parte del trabajo realizado a lo largo de muchos años, que merece ser destacada en el relato del historial evolutivo del grupo. Se han establecido trabajos en colaboración en temas específicos, con colegas de las siguientes instituciones:

- Laboratorio de Biología Celular y Molecular, FCV, UNCPBA.
- Área Parasitología y Enf. Parasitarias, FCV, UNCPBA.
- Instituto de Física Arroyo Seco, Facultad de Ciencias Exactas, UNCPBA.
- Centro Diagnóstico Veterinario (CEDIVE), Chascomús, FCV, UNLP.
- Centro de Desarrollo de Fármacos, UN La Pampa.
- Laboratorio de Parasitología, EE INTA Balcarce.
- Laboratorio de Parasitología, EE INTA Anguil, La Pampa.
- Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Fac. Cs. Exactas y Naturales, UNMDP



- Laboratorio de Farmacotecnia, Dpto. de Farmacia, Ciencias Químicas, Univ. Nacional de Córdoba.
- Laboratorio de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.
- Laboratorio de Farmacología, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Laboratorio de Nanomateriales, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Centro Investigación Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), Uruguay.
- Lab de Farmacología Veterinaria, Universidad Autonoma de Barcelona, España.
- Laboratorio de Parasitología, Embrapa, Bagé, Brasil.
- Laboratorio de de Doenças Parasitárias, Universidad Federal de Paraná, Brasil.
- Lab Parasitología. Pesquisadora Embrapa Pecuária Sudeste, Brasil.
- Lab. Parasitología, Facultad Veterinaria, Universidad de Cajamarca, Perú.
- Institute of Parasitology, McGill University, Montreal, Canadá.
- Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, INRA, Toulouse, Francia.
- Dept of Biological Sciences, Queen's University of Belfast, Irlanda.
- Dept. of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Holanda.
- Moredun Research Institute, Edimburgo, Escocia.
- Laboratorio de Fisiología Veterinaria, Universidad de León, España.
- Dept. of Pharmacology, Veterinary School, Ljubljana, Eslovenia.
- Institute for Parasitology, Escuela de Medicina Veterinaria, Hannover, Alemania.
- Laboratorio de Toxicología, Facultad de Med. Veterinaria, Universidad de Torino, Italia.
- Instituto de Fisiología, Escuela de Medicina Veterinaria, Hannover, Alemania.

Líneas de trabajo actuales. Resumen Técnico del Programa de Investigación.

El programa global comprende diferentes aspectos de la investigación orientada a caracterizar la relación entre farmacocinética, metabolismo, distribución tisular e interacción droga-parásito para fármacos antiparasitarios en animales de producción. Se busca generar información de base farmacológica que abarca desde aspectos moleculares básicos de la relación hospedador-fármaco-parásito, hasta la generación de investigación aplicada que permita caracterizar la influencia de diferentes factores sobre el comportamiento farmacocinético/metabólico y los procesos de distribución tisular y captación parasitaria de drogas antiparasitarias en rumiantes.

Además de la caracterización farmacocinética y de los factores que afectan a la misma, se desarrollan alternativas para incrementar la biodisponibilidad y eficacia de estos fármacos antiparasitarios frente a parásitos resistentes, mediante el desarrollo de formulaciones farmacéuticas alternativas (aplicación de principios de nanotecnología y otras estrategias farmacotécnicas) y a través de la interferencia con diferentes procesos metabólicos y cinéticos (modulación farmacológica). Se incluyen además, estrategias científicas que relacionan conceptos de eflujo celular de drogas con la caracterización molecular de sistemas transportadores celulares involucrados en el metabolismo/excreción de fármacos tanto en el animal hospedador (tracto gastrointestinal) como en el parásito blanco, con especial énfasis en la comprensión de los mecanismos de resistencia.

Tomando a los fármacos **benzimidazoles** como modelo de moléculas antihelmínticas y a las **lactonas macrocíclicas** como modelo de compuestos endectocidas, se caracterizan mediante ensayos **farmacocinéticos *in vivo*, estudios *ex vivo* e *in vitro* de absorción, biotransformación y transporte celular de fármacos/metabolitos, estudios de interacción droga/parásito** (cepas susceptibles y resistentes) y con el apoyo de **técnicas de biología molecular** (*aislamiento y cuantificación de ARN total, síntesis de ADN, amplificación y cuantificación por RT PCR*), diferentes aspectos de base farmacológica que son críticos para optimizar el control antiparasitario. Se desarrollan modelos de infección parasitaria experimental para valorar actividad antihelmíntica de drogas/metabolitos y técnicas para evaluar resistencia a fármacos *in vitro* (evaluación de motilidad larvaria, etc). Además, se plantea la valoración de genotipos resistentes (genotipificación de mutaciones puntuales) a cada tipo de fármaco dentro de las poblaciones parasitarias bajo estudio sometidas a tratamiento. El Programa Global actualmente en desarrollo aborda en forma integral, bajo un enfoque multidisciplinario innovador, la caracterización de numerosos aspectos farmacoparasitológicos moleculares y su proyección al campo práctico en búsqueda de una optimización del control antiparasitario en sanidad y producción animal. Las Secciones Experimentales y sus respectivos Módulos/Líneas de trabajo actualmente en desarrollo, se resumen como sigue:



SECCION EXPERIMENTAL I

BASES FARMACOLOGICAS DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO FARMACOCINETICO EN EL ANIMAL HOSPEDADOR

Módulo I: Optimización de base farmacéutica. Desarrollo/evaluación de formulaciones alternativas.

Módulo II: Caracterización y optimización del proceso de absorción percutánea (tópica) en bovinos

Módulo III: Valoración integral de los procesos de biotransformación hepática e intestinal de fármacos antihelmínticos en rumiantes.

Módulo IV: Evaluación molecular del proceso de eflujo celular de fármacos antiparasitarios mediado por transportadores proteicos

Línea 1. Secreción intestinal de lactonas macrocíclicas. Actividad y expresión de transportadores en intestino

Línea 2. Eflujo celular de fármacos antihelmínticos en líneas celulares con sobreexpresión de proteínas transportadoras

Línea 3. Eliminación de drogas antiparasitarias por leche. Identificación de sistemas de transportadores de fármacos en glándula mamaria

SECCION EXPERIMENTAL II

CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA INTERACCION HOSPEDADOR-DROGA-PARASITO -Interpretación fármaco-parasitológica del fenómeno de resistencia-

Módulo I: Relación entre farmacocinética, distribución tisular y acumulación de droga activa en parásitos susceptibles y resistentes

Línea 1: Caracterización in vivo de la interacción hospedador-droga-parásito. Relación entre nivel de dosis y actividad antihelmíntica sobre parásitos resistentes. Valoración de genotipos resistentes.

Línea 2: Caracterización ex vivo de la interacción droga-parásito. Estudio de la difusión/acumulación de droga en H. contortus susceptibles y resistentes

Módulo II: Valoración farmacológica de la actividad endectocida: perfil de concentraciones en nematodos resistentes.

Línea 1: Difusión/acumulación comparativa de ivermectina, abamectina y moxidectin en H. contortus susceptible y resistente. Correlación con eficacia clínica de cada fármaco.

Línea 2: Nematodes dosis limitantes. Evaluación comparativa del comportamiento cinético y eficacia de ivermectina y moxidectin sobre Cooperia spp. en bovinos.

Módulo III: Combinación de moléculas antihelmínticas en rumiantes. Valoración de interacciones cinéticas y dinámicas (eficacia).

Módulo IV: Triclabendazole y otros fármacos fasciolicidas: relación entre farmacocinética, actividad farmacológica y mecanismos de resistencia.