

Informe final publicable de proyecto

Evaluación de las alternativas terapéuticas de Fluazuron en el control de Rhipicephalus (Boophilus) microplus mediante estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en bovinos naturalmente infectados

Código de proyecto ANII: FMV_1_2017_1_136843

07/06/2021

SUÁREZ VEIRANO, Gonzalo (Responsable Técnico - Científico)

PAREJA, Lucía (Investigador)

ALONSO CROSA, Pablo (Investigador)

ALVARIZA GONZÁLEZ, Silvana (Co-Responsable Técnico-Científico)

BIANCHINOTTI OLIVERA, Vernadet Katheen (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE VETERINARIA (Institución Proponente) \\
INSTITUTO HIGIENE, CAMPO EXPERIMENTAL \\
FACULTAD DE QUÍMICA \\
FACULTAD DE VETERINARIA. FUNDACIÓN MARCO PODESTÁ

Resumen del proyecto

En los sistemas pecuarios, la lucha contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y las enfermedades que ella transmite, han significado y significan para el país una constante preocupación por las pérdidas directas e indirectas que ocasiona principalmente para el sector productivo. El objetivo del presente proyecto fue vincular estudios farmacocinéticos (perfil de concentraciones) y farmacodinámicos (eficacia garrapaticida) en el control estratégico de la garrapata en bovinos, de manera que permitan caracterizar la racionalidad de la estrategia terapéutica para Fluazuron en el contexto epidemiológico de la garrapata en el Uruguay. Mediante estudios de biodisponibilidad relativa entre la aplicación de formulaciones de administración pour-on y subcutánea de Fluazuron, se visualizaron diferencias en los perfiles plasmáticos de concentración. Complementariamente, estudios multicéntricos de la evaluación clínica comparativa a campo a otras alternativas farmacológicas, reafirmaron una disímil respuesta en el tiempo de reducción en el recuento de garrapatas por animal a nivel de campo. Las respuestas obtenidas reafirman como características farmacológicas propias del garrapaticida aplicado, modificación de esquemas de redosificación o la aplicación en categorías animales en diferentes situaciones fisiológicas y productivas, son aspectos determinantes para el éxito terapéutico. Los resultados del proyecto convalidan la importancia del conocimiento epidemiológico y el diagnóstico de sensibilidad histórica a los activos en el predio, como aspectos de vital relevancia en la toma de decisiones para la sustentabilidad del uso racional del fluazuron en diferentes contextos de resistencia a la garrapata.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Farmacología; Parasitología

Palabras clave: Eficacia / Interacción / Garrapata /

Introducción

En los sistemas pecuarios, la enfermedad parasitaria constituye uno de los problemas sanitarios que mayores pérdidas económicas origina (Waller, 2006; Wolstenholme et al., 2004). La lucha contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, garrapata común del ganado bovino, y las enfermedades que ella transmite, han significado y significan para el país una constante preocupación por las pérdidas directas e indirectas que ocasiona principalmente para el sector productivo. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es una de las principales garrapatas que parasita a los bovinos en el área tropical y subtropical (Nari, 2005).

Diferentes medidas de control dirigidas a contrarrestar el efecto nocivo de las parasitosis se emplean y/o se encuentran en desarrollo en la actualidad. Los principales métodos de control pueden clasificarse como: químicos (aplicación de productos acaricidas) y no químicos (aplicación de productos biológicos y de control biológico). A pesar de esto, la medida de control parasitario más utilizada se basa en el uso de tratamientos químicos con ectoparasiticidas neurotóxicos. Sin embargo, la utilización exclusiva y muchas veces sin conocimientos técnicos de esta medida, determinó la aparición de parásitos resistentes a los fármacos de mayor uso. La resistencia parasitaria es 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 la capacidad de sobrevivir al efecto farmacológico de concentraciones terapéuticas de un fármaco, en relación a la población normal (susceptible) de una misma especie (Stone, 1972; Norlan, 1990; Prichard, 1994).

En Uruguay, a nivel del control de las poblaciones de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el bovino y el fenómeno de resistencia es preocupante. En la actualidad son los tratamientos químicos casi el único recurso disponible con el que cuentan los productores para el control de este parásito (Fiel y Nari, 2013). Durante décadas estas poblaciones de garrapatas se controlaron mediante baños de inmersión con acaricidas arsenicales, hacia el 1950 debido a la resistencia generada fueron sustituidos por acaricidas clorados, luego comenzaron a emplearse los organofosforados pero en el 1978 se registró resistencia y fueron reemplazados por acaricidas en base a piretroides sintéticos (tipo I: alletrina, tetrametrina, permetrina y los tipo II: cipermetrina, fenvalerato, cialotrina) (Picco, E., 2009), siendo el primer diagnóstico de resistencia en Uruguay en 1994 (Cardozo 1995, citado por Fiel y Nari, 2013). Posteriormente en el 2006 se diagnosticó oficialmente resistencia a la molécula Fipronil (Fenilpirazoles) (Cuore y col., 2007), en 2009 al Amitraz (Amidinas) (Cuore y col., 2012) y en 2010 a Ivermectina y Moxidectin (Lactonas Macroclínicas) (Cuore y col., 2015a). De los principios activos aprobados para su uso en la campaña de lucha contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sólo frente al Fluazurón

(Benzoilurea) no se ha diagnosticado resistencia (Cuore et al., 2012). Nuevos estudios continúan confirmado un agravamiento del problema, con diferentes poblaciones parasitarias involucrados en la resistencia a diferentes principios activos (Cuore et al., 2016).

En nuestro país, ya se encuentra establecido el ciclo epidemiológico de la principal especie de garrapata involucrada en el problema, Entre los años 1975-1981, Nari y Cardozo realizaron estudios sobre la ecología del *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay, determinando un claro comportamiento de la garrapata, con tres generaciones al año y una interrupción del ciclo no parasitario en los meses de invierno (Cardozo et al, 1984; Nari et al., 1995). Este conocimiento permitió diseñar un "Modelo Epidemiológico Conceptual", de importancia crucial para el control estratégico de la garrapata en nuestro País (Fiel y Nari, 2013). Según estudios de ecología del *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en tres áreas del Uruguay, se pudo constatar que se presentan tres generaciones de garrapata al año, en condiciones epidemiológicas de campo abierto (litoral Norte) y tres y media generaciones al año en condiciones de abrigo bajo monte (costas del Río Uruguay) (Fiel y Nari, 2013).

La aplicación estratégica de drogas eficaces con diferente mecanismo de acción (control no neurotóxico), en lugar de las de control neurotóxico, ajustado a las condiciones epidemiológicas que predominan para la garrapata, es una de las alternativas posibles cuando existe resistencia a los principales grupos disponibles. Cuore et al. en 2008 mencionan que la mayoría de los tratamientos químicos registrados se presentan en base a productos de aplicación parenteral de forma inyectable (administración subcutánea) o derrame dorsal (pour-on). Permitiendo inferir que no solo los principios activos tienen relevancia frente al control ectoparasiticida, sino las diferencias farmacotécnicas en las presentaciones farmacéuticas que se encuentran disponibles para un mismo principio activo, como por ejemplo el propuesto para estudio en el presente proyecto (Fluazurón).

Descripción del problema a ser abordado

Dado el alto costo y el bajo retorno económico que implica el desarrollo de nuevos principios activos antiparasitarios, la aparición de principios activos novedosos con diferentes mecanismos de acción y resistencia, ha sido muy limitada (Geary et al., 1999; Molento et al., 2011). El principal foco en la industria farmacéutica se encuentra en el campo del desarrollo de nuevas alternativas farmacotécnicas sobre los mismos principios activos. Modificaciones en el comportamiento farmacológico del principio activo (cambios farmacocinéticos) pueden afectar la concentración y/o período de tiempo en el que los parásitos están expuestos al fármaco activo y, en consecuencia, la eficacia clínica y el tiempo de espera de los tratamientos. Por tal motivo, es necesario optimizar el uso de los antiparasitarios disponibles, utilizándolos de forma racional y preservando su finalidad terapéutica en el marco de un programa de control sustentable de parásitos en Salud y Producción Animal.

Fluazurón (FLU) es un ectoparasiticida de la familia de los benzoilfenilureas, desarrollado para ser utilizado como inhibidor del desarrollo de la garrapata, con un amplio uso en Australia y América Latina, con la finalidad de controlar principalmente *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Lowik et al., 2001). Su utilización es dentro del esquema de rotación de los grupos químicos neurotóxicos empleados en el control de garrapatas. En nuestro país, FLU es una de las alternativas actuales de control parasitario para el control de cepas resistentes a los principales grupos químicos utilizados en el control de garrapatas (Cuore et al., 2012). Las formas farmacéuticas disponibles actualmente en Uruguay, son en solución de aplicación pour-on, a la dosis indicada de 2,5 mg/kg (Acatax®, Elanco) y en solución de aplicación inyectable por vía subcutánea, a la dosis de 2,5 mg/kg combinada con ivermectina (IVM; 0.2 mg/kg) (Ticksan®, La Buena Estrella). Las principales diferencias son claramente perceptibles, debido a que involucran dos formulaciones farmacotécnicas diferentes. La alternativa a nivel nacional (forma farmacéutica inyectable), incorpora un segundo principio activo (IVM) a su formulación, lo cuál debe ser caracterizado desde el punto de vista farmacológico (interacciones farmacocinética). Si bien la forma farmacéutica resulta en un beneficio desde el punto de vista de la practicidad en el control de la garrapata, es necesario determinar si la calidad farmacotécnica modifica el efecto final alcanzado mediante un diseño de estudio de biodisponibilidad, caracterizando el proceso farmacocinético del FLU en las distintas alternativas farmacéuticas en un contexto de control integrado o un programa de control o erradicación de la garrapata.

De los aspectos a considerar en el uso de FLU como alternativa terapéutica, se destaca lo relacionado a la dosis utilizada, los datos farmacocinéticos de la droga, el impacto en la inocuidad sobre el bovino y el efecto garrapaticida alcanzado. FLU

en Uruguay actualmente está indicado a la dosis de 2,5 mg/kg (Acatak®, Elanco, Uruguay), no obstante, su registro internacional recomienda dosis que varían de 1,5 a 2,5 mg/kg. Dichas diferencias alcanzan un 40% entre las dosis recomendadas actualmente en los productos utilizados en Uruguay (Acatak®, Uruguay). Si bien en bovinos, en la actualidad no se reportan estudios de resistencia, previo a su empleo en la campaña sanitaria estudios controlados oficiales a nivel de establo fueron realizados para confirmar la eficacia garrapaticida de la droga al momento de su registro. Las dosis evaluadas se describen a 2,5 mg/kg en un esquema de control/erradicación para ambos productos, difiriendo sustancialmente en el momento de su re-aplicación. Es de esperar que diferencias importantes al momento de su empleo deban ser tenidas en cuenta.

Con relación a los datos farmacocinéticos del FLU, existen escasos antecedentes publicados que integren aspectos farmacológicos y parasitológicos en condiciones de campo con las formulaciones hoy disponibles en el Uruguay. Estudios reportan un beneficio desde el punto de vista parasitológico con el uso combinado de FLU y abamectina (Cruz et al., 2014), pero los mismos no tienen una caracterización farmacológica. El conocimiento de los parámetros primarios de clearance (CL) y semivida de eliminación ($t_{1/2}$), ambos parámetros farmacocinéticos determinantes para el cálculo de dosis e intervalos de dosificación, es determinante para el cálculo del tiempo de espera en los animales que reciben el tratamiento. De ambos se deriva el volumen de distribución (Vd), el cual da cuenta de la relación entre la concentración medida en sangre y la cantidad de fármaco presente en el organismo. Zhang et al., (2013), reportan un estudio clínico en el que establecen la seguridad del FLU luego de su administración a la dosis de 1,5 mg/kg por vía subcutánea reportando los niveles divergentes encontrados en los diferentes tejidos animales. En la actualidad, FLU es el residuo marcador de elección para utilizar en los sistemas de vigilancia de la exposición a sustancias químicas (residuos).

En bovinos, no se conocen datos que correlacionen variaciones en la farmacotécnica de las formulaciones con los niveles de exposición plasmático, ni las características de disposición sanguínea del fármaco para el control parasitario. Siendo esto último, un aspecto crucial para determinar el mínimo intervalo para re dosificación del FLU o su uso estratégico con otros principios activos disponibles.

Resultados esperados

Caracterizar las estrategias de control farmacológico, e integrar estudios fármaco-parasitológicos nacionales, que reflejen el conocimiento del impacto de las estrategias de control químico con el uso de formulaciones de diferentes principios activos, posologías y medicamentos en el control parasitario.

Contribuir con estudios nacionales a aplicación estratégica de Fluazuron y/u otros principios activos en el control integral de la garrapata en situaciones reales de presencia de la parasitosis.

Describir los aspectos fármaco-parasitológicos integrados de la aplicación única o combinada de FLU / IVM en formulaciones garrapaticidas de administración parenteral por vía pour on / subcutánea en bovinos. Aportando conocimiento en el ajuste de la terapéutica de los bovinos afectados por garrapatas del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*.

Ampliar la información de las herramientas terapéuticas de relevancia en la campaña de control de garrapatas en bovinos que lleva a cabo en el Uruguay (Campaña Sanitaria). Recordando que el empleo de diferentes familias farmacológicas sin un esquema posológico claro, puede dar lugar a que se presenten interacciones farmacológicas que podrían afectar la eficacia clínica del tratamiento o generar un riesgo a la inocuidad del alimento (incremento en los tiempos de depleción tisular).

Consolidar la formación de recursos humanos en una línea de trabajo original para Uruguay, que integre la Farmacología Veterinaria y la Parasitología.

Metodología/diseño del estudio

La metodología consistió en trabajos experimentales en el medio y determinaciones analíticas en el laboratorio. Los trabajos de campo se llevarán a cabo en diferentes establecimientos agropecuarios comerciales ubicado en zonas libres o endémica (presencia de garrapata) del Uruguay. Las cuantificaciones analíticas se realizaron en laboratorio de la Facultad de Veterinaria y Química de la UdelaR.

1. Validación y cuantificación de Fluazuron e Ivermectina en plasma bovino.

Las determinaciones de IVM se desarrollaron en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Veterinaria-UDELAR, a diferencia de las realizadas a FLU que se implementaron en Grupo de Análisis de Compuestos Traza (GACT), Cenur-UdelaR.

Ivermectina

Para Ivermectina se realizó la cuantificación en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de acuerdo con la metodología validada por HPLC-Fluorecencia, estableciéndose linealidad en el rango de 5 a 80 ng/mL, con un límite de determinación de 1 ng/mL (Suarez et al., 2016).

Fluazuron

Se validó una metodología para Fluazuron en base a lo publicado por Paes Ferreira et al. (2015) con modificaciones, utilizando un equipamiento de HPLC-UV y siguiendo las recomendaciones de las guías VICH sobre validación de técnicas analíticas. Sin embargo, los límites de cuantificación resultaron insuficientes (50 ng/mL), por lo que se implementó con Facultad de Química una nueva metodología por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) con un límite de cuantificación de 5 ng/mL, siguiendo los criterios establecidos (European Commission DG-SANCO, 2017).

2. Ensayos experimentales

2.1 Biodisponibilidad relativa e Interacciones farmacológicas (PK)

Objetivo del ensayo: Estudiar en bovinos la Biodisponibilidad relativa de Fluazuron e Ivermectina luego de su aplicación por vía subcutánea (2,5mg/kg / 12,5% y 0,2mg/kg / 1%, respectivamente) y determinar las potenciales diferencias en los perfiles farmacocinéticos de la aplicación subcutánea combinada de ambas moléculas con las formulaciones de referencia en plaza (Fluazuron [Pour-on / 2,5mg/kg / 2,5%] e Ivermectina [subcutánea / 0,2mg/kg / 1%]).

Lugar: Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Canelones.

Período del estudio: 3 meses

Diseño: 30 animales de sobreaño de raza Hereford, sin antecedentes de tratamientos antiparasitarios en los 60 días previos al inicio del ensayo, fueron asignados a tres grupos (n=10). Grupo IVM: animales que recibieron ivermectina en administración subcutánea (0,2 mg/kg de peso vivo, 1%, Ivomec®, Merial, Uruguay); Grupo PO: animales que recibieron fluazuron en administración tópica pour-on (2.5 mg/kg peso vivo, FLU 2,5%, Acatak®, Elanco, Uruguay) y Grupo REF: animales que recibieron la combinación Fluazuron + Ivermectina por vía subcutánea (2.5 mg/kg y 0.2 mg/kg peso vivo, FLU 12,5% + IVM 1%, respectivamente, Tickxan®, La Buena Estrella, Uruguay). En todos los grupos se realizó un muestreo sanguíneo hasta los 50 días posteriores a la dosificación, y el plasma obtenido fue analizado mediante HPLC-Masa (FLU) o HPLC-Fluorecencia (IVM).

2.2 Estudios de eficacia compartiva I, II, III y IV.

Todos los estudios realizados en el marco de caracterizar la eficacia parasitaria a campo tuvieron como objetivo comparar la performance de la aplicación de Fluazuron (Pour-on y/o subcutáneo) con otras alternativas comerciales de uso frecuente para el tratamiento de garrapatas del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. En todos los ensayos los animales incluidos fueron mantenidos sin tratamiento garrapaticida previos al inicio de los ensayos. La asignación a grupos se realizó al día 0 siempre de forma aleatoria y con evaluación de dos operadores a ciegas.

Esquema general de registro a campo: Los animales se evaluaron individualmente mediante la inspección visual/táctil del lado izquierdo y las entrepiernas en busca de la presencia de garrapatas. Los resultados fueron registrados siguiendo un esquema de clasificación por rangos: 0=sin observación, 1=observación de menos de 20 teleóginas o 2=observación de más de 20 teleóginas. Para una mejor visualización de los resultados en esta etapa, los resultados se recodifican y se presentan en las figuras considerando únicamente ausencia (0) o presencia (1 y 2).

2.2.1 Eficacia comparativa I (PD):

Objetivo del ensayo: comparar el comportamiento diferencial en el control y tratamiento de garrapatas a campo, de alternativas comerciales de Fluazuron (pour-on [2,5%] y subcutánea [12,5%]) de Fluazuron combinado con IVM, frente a las otras alternativas de control disponibles, como son Ivermectina (1% y 3.15%, Subcutánea) y Fipronil (10%, pour-on).

Ubicación: establecimiento productivo cercano a la ciudad de Minas, Departamento de Lavalleja.

Período del estudio: 2 meses

Diseño: Los antecedentes más próximos indicaban la presencia de la enfermedad parasitaria, manteniendo un esquema de tratamientos preventivos. 47 bovinos de 2 a 3 años fueron incluidos en el ensayo a campo, constatando al inicio del ensayo únicamente un 15% de animales con presencia de garrapatas. Los animales fueron asignados en mayor o menor medida a cinco grupos experimentales (n=5 a 14). Los animales fueron dosificados de acuerdo al siguiente esquema: Grupo IVM_1%: Ivermectina, 0,2 mg/kg, subcutánea, 1%, Ivomec®, Merial, Uruguay; Grupo IVM_3.15%: Ivermectina, 0,63 mg/kg, subcutánea, 3.15%, Cibeles, Uruguay; Grupo REF: combinación Fluazuron (12,5%) + Ivermectina (1%), 2,5 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente, subcutánea, Tickxan®, La Buena Estrella, Uruguay y Grupo POURon_FLU: Fluazuron, 2,5 mg/kg, pour-on, 2,5%, Acatak®, Elanco, Uruguay. El quinto grupo se realizó con el tratamiento habitual que aplicaba el productor, Grupo POURon_FIPRO: Fipronil, 10mg/kg, 10%, pour-on. No se incluyó un grupo TESTIGO por razones del potencial impacto en el control epidemiológico y sanitario que realizaba el propio establecimiento (Programa de control generacional). Los controles posteriores se realizaron al día 7 y 36 posdosificación.

2.2.2 Eficacia comparativa II:

Objetivo del ensayo: Manteniendo un grupo control, se pretendió comparar el comportamiento diferencial en el control y tratamiento de garrapatas de alternativas comerciales de Fluazuron (pour-on [2,5%] y subcutánea [12,5%]) de Fluazuron combinado con IVM, estableciendo diferentes esquemas de redosificación.

Ubicación: establecimiento productivo en la localidad de Valentines, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay.

Período del estudio: 4 meses

Diseño: El predio presentaba antecedentes de control aleatorio en base a Ivermectina, 60 días previos a iniciar el ensayo se discontinuó los tratamientos de manera de iniciar con una alta carga parasitaria. 49 bovinos hembras (vacas de cría) fueron incluidos en el ensayo a campo, constatando al inicio del ensayo un 61% de animales con presencia de garrapatas. Los animales fueron asignados en mayor o menor medida a cinco grupos experimentales (n=6 a 20). Los animales fueron dosificados de acuerdo al siguiente esquema: Grupo IVM_1%: Ivermectina, 0,2 mg/kg, subcutánea, 1%, Ivomec®, Merial, Uruguay; Grupo REF: combinación Fluazuron (12,5%) + Ivermectina (1%), 2,5 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente, subcutánea, Tickxan®, La Buena Estrella, Uruguay y Grupo POURon_FLU: Fluazuron, 2,5 mg/kg, pour-on, 2,5%, Acatak®, Elanco, Uruguay. El quinto grupo fue el TESTIGO, el cual consistió en un grupo de animales que se mantuvieron sin tratamiento por un tiempo limitado. El objetivo dentro del presente grupo fue incluir animales con y sin carga parasitaria de manera que funcionaran como centinelas del grado de desafío durante el estudio. Se instauró un protocolo de rescate en los animales del grupo TESTIGO por razones del potencial impacto clínico negativo. Los controles posteriores se realizaron al día 6, 14, 21, 28 y 42 posdosificación. Las redosificaciones se establecieron siguiendo el siguiente esquema: Grupo IVM_1% se lo redosificó con IVM_3.15% al día 14, el grupo REF se redosificó nuevamente a los 14 días. El grupo POURon_FLU permaneció con un único tratamiento durante 42 días. A los animales del grupo TESTIGO que requirieron un rescate o aquellos que inicialmente no presentaban carga parasitaria pero sí la al momento de la evaluación al día 14, se los dosificó e incluyó en los grupos POURon_FLU y REF.

2.2.3 Eficacia comparativa III:

Objetivo del ensayo: Se evaluó el efecto garrapaticida preventivo/curativo de la frecuencia de aplicación de alternativas comerciales de Fluazuron (Pour-on [2,5%] y subcutánea [12,5%+Ivermectina 1%]), Ivermectina (1% y 3.15%, Subcutánea) y Fipronil (10%, Pour-on) en bovinos, en un momento epidemiológico favorable con desafío parasitario en el ambiente y sin considerar como opción válida mantener un grupo control

Ubicación: establecimiento productivo en el Departamento de Salto

Período de evaluación: 2 meses

Diseño:

En un esquema de control estratégico con baños de inmersión cargado con Amitraz y posterior a los 15 días del último tratamiento, 86 animales de raza Aberdeen Angus fueron incluidos en el ensayo a campo. Los animales fueron asignados en mayor o menor medida a cinco grupos (n=15 a 28). Los animales fueron dosificados de acuerdo al siguiente esquema: Grupo IVM_1%: Ivermectina, 0,2 mg/kg, subcutánea, 1%, Ivomec®, Merial, Uruguay (n=14); Grupo IVM_3.15%: Ivermectina, 0,63 mg/kg, subcutánea, 3,15%, Cibeles, Uruguay (n=16); Grupo REF: combinación Fluazuron (12,5%) + Ivermectina (1%), 2,5 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente, subcutánea, Tickxan®, La Buena Estrella, Uruguay (n=21) y Grupo POURon_FLU:

Fluazuron, 2,5 mg/kg, pour-on, 2,5%, Acatak®, Elanco, Uruguay (n=22). Grupo POURon_FIPRO: Fipronil, 10mg/kg, 10%, pour-on (n=15). En vista al nivel de desafío parasitario, se aplicó como medida de control una redosificación (igual dosis y vía administración) a todos los grupos el día 19 postratamiento. Los controles se realizaron al día 0, 6, 19, y 34 posdosificación.

2.2.4 Eficacia comparativa IV:

Objetivo del ensayo: Evaluar la aplicación estratégica de Fluazuron (Pour-on [2,5%]) en el periparto bovino en presencia endémica de la parasitosis, mediante el uso diferencial del área de extensión en el lugar de aplicación a igual dosis (2,5mg/kg; tratamiento largo= 60cm vs. corto= 30cm). Los antecedentes del establecimiento indicaban sensibilidad a todos los principios activos incluidos en el ensayo.

Ubicación: establecimiento productivo en el Departamento de Artigas

Período de evaluación: 6 meses

Diseño:

En un esquema de control estratégico generacional, 359 vacas de la raza Hereford en el periparto fueron incluidas en el ensayo a campo. Los animales fueron asignados a tres potreros problemas (antecedentes del establecimiento) y dosificados con Fluazuron (2,5 mg/kg, pour-on, 2,5%, Acatak®, Elanco, Uruguay) de acuerdo al siguiente esquema: Grupo Corto (30cm; n=180) (Potrero 16 (n=45); Potrero 17 (n=62) y Potrero 19 (n=73)) y Grupo Largo (60cm; n=179) (Potrero 16 (n=45); Potrero 17 (n=61) y Potrero 19 (n=73)). Al inicio del estudio 60% vacas habían parido dentro de los 30 días previos y 40% lo harían dentro de los 30 días posteriores a la aplicación de Fluazuron. Se reiteró la dosificación 3 veces más, aproximadamente cada 42 días. Muestras de sangre de algunas madres y terneros fueron extraídas para evaluar dentro de un esquema de diseño preliminar piloto los niveles plasmáticos en la población.

Resultados, análisis y discusión

[Ver en anexo figuras y tablas del documento]

2.1 Biodisponibilidad relativa e Interacciones farmacológicas (PK)

Principales resultados: en la figura 1 / tabla 1 y figura 2 / tabla 2 se presentan los perfiles de concentración y parámetros farmacocinéticos en función del tiempo para IVM y FLU, respectivamente en los distintos grupos experimentales.

Figura 1. Concentraciones plasmáticas individuales de Ivermectina tras la administración subcutánea combinada (REF) o única (IVM) en bovinos.

Tabla 1. Parámetros Farmacocinéticos de Ivermectina tras la administración subcutánea combinada (REF) o única (IVM) en bovinos.

Figura 2. Concentraciones plasmáticas individuales de Fluazuron tras la administración subcutánea combinada (REF) o Pour-on única (FLU) en bovinos.

Tabla 2. Parámetros Farmacocinéticos de Fluazuron tras la administración subcutánea combinada (REF) o Pour-on única (FLU) en bovinos.

Del ajuste del modelo farmacológico y la determinación de los principales parámetros farmacocinéticos claramente se visualiza una importante diferencia a nivel de los perfiles de concentración del Fluazuron, indicando un comportamiento farmacocinético diferente entre REF (Formulación combinada de administración Subcutánea) y PO (FLU, Formulación de administración Pour-on). A diferencia, el ajuste del modelo farmacológico para Ivermectina de ambas formulaciones manifiesta cambios menores a los visualizados para Fluazuron, indicando perfiles similares en la administración subcutánea de IVM con ambas formulaciones.

2.2 Estudios de eficacia compartiva I, II, III y IV.

2.2.1 Eficacia compartiva I (PD):

Principales resultados: en el cuadro 1 se presentan los porcentajes de Presencia/Ausencia de garrapata en cada grupo

experimental en los distintos tiempos de evaluación.

Cuadro 1. Ausencia/Presencia de garrapatas (%) posdosificación a diferentes tiempos de evaluación

La interpretación de los resultados indica que: 1) un nivel de infestación bajo en el predio, 2) un adecuado nivel de protección a los 7 y 36 días en todos los grupos, salvo 1 animal que presentó una única garrapata en el grupo REF a los 7 días de aplicado. Aspecto que podría ser indicativo de un tiempo de retraso en su accionar, 3) No se visualizan ventajas entre formulaciones evaluadas y 4) El predio presentó un perfil de sensibilidad adecuado.

2.2.2 Eficacia comparativa II:

Principales resultados: en el cuadro 2 se presentan los porcentajes de Presencia/Ausencia de garrapata de los grupos experimental y tiempos de evaluación más relevantes. A los 42 días de evaluación se definió la finalización del estudio, en vista a que el grupo TESTIGO no presentó carga parasitaria y que el porcentaje global de presencia del parásito era de 2,4%. Resultado en concordancia con el momento epidemiológico y la situación climática puntual del ensayo.

Cuadro 2. Ausencia/Presencia de garrapatas (%) posdosificación a diferentes tiempos de evaluación

De forma preliminar, podemos visualizar que siguiendo el esquema de redosificación: 1) el grupo IVM permitió discernir sobre la importancia del tiempo de exposición a las drogas, indicando que la mayor exposición en la formulación 3,15% es ventajosa frente a la formulada al 1%; 2) La formulación combinada no fue efectiva en controlar los estadios evolutivos (14 días), requiriendo una nueva dosificación y mayor tiempo de exposición; 3) La formulación Pour-on resulto parcialmente efectiva sobre los estadios evolutivo iniciales (larvas), con un mayor grado de control en la carga parasitaria que las alternativas evaluadas, 71% vs. 38% y 45%.

2.2.3 Eficacia comparativa III:

Principales resultados: en el cuadro 3 se presentan los porcentajes de Presencia/Ausencia de garrapata de los grupos experimental y tiempos de evaluación más relevantes. A los 34 días de evaluación se definió la finalización del estudio, en vista al porcentaje de 72% de presencia del parásito en los animales. Resultado en concordancia con un desafío parasitario acorde al momento epidemiológico y la situación climática puntual del ensayo.

Cuadro 3. Ausencia/Presencia de garrapatas (%) posdosificación a diferentes tiempos de evaluación

En un esquema de "sincronización" de la carga parasitaria post 15 días de aplicado un baño de inmersión con Amitraz, con indicios de falla terapéutica, se visualiza un control adecuado de un único principio activo. 1) La aplicación de IVM en sus dos presentaciones funcionaron adecuadamente (100% ausencia), marcando claras diferencias en el tiempo de persistencia de la protección (3,15% > 1%); 2) La presencia de combinada de FLU+IVM en la formulación combinada, presentó un comportamiento disímil a la aplicación única de IVM por igual vía, con tendencia a un menor porcentaje de presencia del parásito en REF. A diferencia que la aplicación pour-on de FLU en donde los efectos máximos en cada formulación se invierten en el tiempo (REF=6 días; POURon_FLU=19 días). Sustenta la hipótesis de un comportamiento diferencial en la farmacocinética de los principios activos (ver. ensayo experimental 1); 3) El activo fipronil no represento ser una opción superior a los otros otros tratamientos evaluados.

2.2.4 Eficacia comparativa IV:

Principales resultados: El esquema de evaluación del uso de Fluazuron para el presente ensayo evalúa en forma invertida la acción terapéutica, siendo el foco evitar el escalado epidemiológico generacional de la parasitosis. En la figura 3 y 4 se presentan los principales resultados vinculados a las concentraciones plasmáticas encontradas previo a la tercer y cuarta redosificación en ambos grupos experimentales y terneros implicados en el estudio.

Figura 3. Concentraciones plasmáticas de Fluazuron tras la administración pour-on largo o corta en vacas a los 77

(segundo tratamiento) y 117 (tercer tratamiento) días de iniciado el tratamiento.

Figura 4. Concentraciones plasmáticas de Fluazuron en vacas y terneros tras la administración pour-on largo o corta en vacas a los 77 (segundo tratamiento) y 117 (tercer tratamiento) días de iniciado el tratamiento.

Si bien existieron diferencias entre los niveles de concentración entre categorías (ternero vs vaca) y tiempo de aplicación (segundo [día 77] y tercer tratamiento [día 117]), las evaluaciones no resultaron en diferencias entre esquemas de tratamientos largo y corto en la presencia de la parasitosis en el tiempo que se mantuvo el tratamiento (agosto a diciembre). En ambas categorías (vaca y ternero) se vieron beneficiadas por el uso exclusivo en la vaca.

Conclusiones y recomendaciones

Las principales conclusiones y recomendaciones del presente estudio se podrían enumerar sin un orden de relevancia en los siguientes puntos:

- 1) La metodología analítica mediante HPLC-UV para Fluazuron a diferencia de la Ivermectina, no alcanzaría para la determinación de cuantificaciones necesarias a nivel plasmático luego de la administración de una única dosis, siendo necesario desarrollar metodologías analíticas de alta resolución como son las implementadas a través de espectrometría de masas.
- 2) Los perfiles farmacocinéticos de Fluazuron e Ivermectina se diferencian sustancialmente, determinando que los tiempos de actividad y de persistencia de sus concentraciones se diferencian claramente entre ambos metabolitos. Si bien la aplicación combinada de IVM/FLU no representa una modificación cinética para IVM, la modificación en la forma farmacéutica, formulación o aplicación representaría una importante fuente de variabilidad en los perfiles de concentración que se enfrentarían las poblaciones parasitarias para Fluazuron.
- 3) A nivel de campo, las diferencias farmacocinéticas reportadas parecieran ser suficientes para establecer un estatus de control acorde entre ambas alternativas terapéuticas, siempre que la población manifieste un perfil de sensibilidad elevado.
- 4) En un esquema de control parasitario en diferentes escenarios de sensibilidad de la garrapata, el comportamiento del FLU representó un punto diferencial a otros principios activos (Ivermectina, Fipronil, Amitraz). La variabilidad de la respuesta individual se asocia con el lugar de estudio, categoría tratada, raza estudiada y antecedentes de aplicación en el predio.
- 5) Los tiempos de exposición y la persistencia de concentraciones que potencialmente aportan la variabilidad de formulación, así como las redosificaciones establecidas a tiempos acordes al etiquetado propuesto por los organismos oficiales, son relevantes y determinantes para alcanzar una efectividad objetivo en los esquemas de control y erradicación de la garrapata.
- 6) La conjunción de un elevado desafío parasitario (campo) junto a un pobre status de sensibilidad en la población parasitaria a ser controlada, es determinante en la visualización de fracasos terapéuticos a corto y largo plazo. Planes de control sanitario sin estudios complementarios de diagnóstico que permitan caracterizar el grado de sensibilidad a los principios activos en la población parasitaria son cruciales para el diseño estratégico de planes sanitarios de control o erradicación de la garrapata. El control de la garrapata debe sustentarse en conceptos epidemiológicos que involucren aspectos de la ecología del ciclo biológico de la garrapata.
- 7) Esquemas de tratamiento sobre categorías en etapa de lactación o recomendaciones empíricas en la aplicación de antiparasitarios deben ser evaluados y sustentados en base a la validación experimental. El control en categorías sensibles (vaca con ternero al pie) en condiciones de campo no pareciera ser relevante para limitar que el Fluazuron alcance su máxima absorción, ni que limite su desempeño el pasaje a través de la leche al ternero para alcanzar niveles de protección en la categoría.
- 8) Los aspectos terapéuticos en los programas de dosificación reiterada que habitualmente integran los planes sanitarios para el control de garrapatas deberían contemplar el potencial impacto del efecto acumulativo con cada re-administración.

En suma, el Fluazuron representa una de las herramientas de control químico disponible en la actualidad, con validada incidencia dentro de los esquemas de rotación químico para los planes sanitarios de control y erradicación de la garrapata, que para su sustentabilidad requerirá de mayores conocimientos del ciclo biológico del parásito y su epidemiología, así como un entendimiento de un enfoque población de la Farmacometría para el modelado y simulación de procesos farmacológicos del Fluazuron en bovinos, al momento de su utilización.

Referencias bibliográficas

- Baggot, J.; McKellar, Q. (1994). The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 17, 409-419.
- Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., Lopez, A., Donatti, N., (1984). Estudios sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzooticas del Uruguay. *Vet. Uruguay*, 20: 4-10.
- Cruz BC; Teixeira WF; Maciel WG; Felippelli G; Fávero FC; Cruz AC; Buzzulini C; Soares VE; Gomes LV; Lopes WD; de Oliveira GP; da Costa AJ. (2014). Effects of fluzuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluzuron 3.0 mg/kg & abamectin (0.5 mg/kg) on the reproductive parameters of a field population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on experimentally infested cattle. *Res. Vet. Sci*, 97(1):80-4.
- Cruz, B.C., Teixeira, W.F.P., Maciel, W.G., Felippelli, G., Fávero, F.C., Cruz, A.C., Buzzulini, C., Soares, V.E., Gomes, L.V.C., Lopes, W.D.Z., de Oliveira, G.P., da Costa, A.J., (2014). Effects of fluzuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluzuron (3.0 mg/kg) & abamectin (0.5 mg/kg) on the reproductive parameters of a field population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on experimentally infested cattle. *Research in Veterinary Science*, 97, 80–84.
- Cuore U, Trelles A, Sanchís J, Gayo V, Solari MA. (2007). Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria* 42:35-41
- Cuore, U., Altuna, M., Cicero, L., Fernbandez, F., Luengo, L., Mendoza, R., Nari, A., Perez Rama, R., Solari, M., Trelles, A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multiresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (187) 1-9.
- Cuore, U.; Acosta, W.; Bermúdez, F.; Da Silva, O.; García, I.; Pérez Rama, R.; Luengo, L.; Trelles, A. & Solari M. A. (2015). Tratamiento generacional de la garrapata. Aplicación de una metodología en un manejo poblacional para la erradicación de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a lactonas macrocíclicas *Veterinaria (Montevideo)* 51 (198) 14-25.
- Cuore, U.; Cardozo, H.; Trelles, A.; Nari, A.; Solari, M.A. (2008). Características de los garrapaticidas utilizados en Uruguay. Eficacia y poder residual. *Veterinaria (Montevideo)* 43 (169) 13-24.
- Cuore, U.; Solari, M. A.; Piaggio, J.; Chelle, B.; Di Rienzo, D.; Machado, N.; Politi, P.; Trelles, A. & Rampoldi, O. (2016). Comportamiento biológico y farmacocinético de dos formulaciones comerciales de ivermectina 3,15% en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)* Volumen 52 (201) 13-22.
- Fiel, C. A.; Anziani, O.; Suárez, V.; Vázquez, R.; Eddi, C.; Romero, J.; Caracostantogolo, J.; C. Saumell, C.; Mejía, M.; Costa, J. y Steffan, P. 2001a. Resistencia antihelmíntica en bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis. *Vet. Arg.* Vol. XVIII, 171:21-33.
- Fiel, C.; Nari, A. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Montevideo, UY: Hemisferio Sur. 752 p.
- Geary, T. G., Thompson, D. P., & Klein, R. D. (1999). Mechanism-based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *International journal for parasitology*, 29(1), 105-112.
- Holdsworth, P.A.; Kemp, D.; Green, P.; Peter, R.J.; De Bruin, C.; Jonsson, N.N.; Letonja, T.; Rehbein, S.; Vercruyssen, J. (2006). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Veterinary Parasitology* 136; 29–43.
- Lifschitz, A.; Virkel, G.; Pis, A.; Imperial, F.; Sanchez, S.; Alvarez, L.; Kujanek, R.; Lanusse, C. (1999). Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Vet Parasitol*; 86:203-

Molento, M. B.; Nielsen, M. K.; & Kaplan, R. M. (2012). Resistance to avermectin/milbemyacin anthelmintics in equine cyathostomins—current situation. *Veterinary parasitology*, 185(1), 16-24.

Molento, M.B.; Fortes, F.S.; Pondelek, D.A.S.; Borges, F.d.A.; Chagas, A.C.d.S.; Torres-Acosta, J.F.d.J.; Geldhof, P. (2011). Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*. 180, 126-132.

Nari, A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Veterinary Parasitology*, 57, 153-165.

NARI, A. 2005. Estado actual de la resistencia de *Boophilus microplus* en America Latina y el Caribe. Perspectivas de aplicación del control integrado. Roma, Italia: FAO.

Nari, A., Cardozo, H. and Petraccia, C. (1984). Resistencia de *Boophilus microplus* a los acaricidas organofosforados en el Uruguay. *Vet. Uruguay*, 20: 23-29.

Nari, A., Cardozo, H., Berdie, J. and Canabez, F., (1979). Estudio preliminar sobre la ecología del *Boophilus microplus* (Can) en Uruguay. Ciclo no parasitario en un área considerada poco apta para su desarrollo. *Vet. Uruguay*, 15: 25-31.

Nolan, J., (1990). Acaricide resistance in single and multi-host tick and strategies for control. *Parasitologia* 32, 145–153.

Picco, E. J. (2009). Influencia de los estados fisiológicos en la disposición cinética de clorpirifós en bovinos (Doctoral dissertation).

Prichard, R. (1994). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. 54, 259-268.

Rodríguez-Vivas RI, Quiñones A.F., Fragoso S.H. (2005). Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Rodríguez-Vivas, RI (ed) Enfermedades de importancia económica en producción animal. McGraw-Hill- UADY. México D.F., México, Pp. 571-592.

Stone, B.F. (1972) The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Australian Veterinary Journal* 48: 345-350.

Waller, P.J. (2006). Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology*. 126, 277-289.

Wolstenholme, A.J.; Fairweather, I.; Prichard, R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Sangster, N.C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 20, 469-476.

Zhang, X., Lionberger, R., Davit, B., and Yu, L. (2010). Utility of Physiologically Based Absorption Modeling in Implementing Quality by Design in Drug Development. *The AAPS Journal*, 13, 59-71.

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)