

Equivalencia terapéutica de la administración
subcutánea de Ivermectina en el control de
Rhipicephalus (Boophilus) microplus mediante
formulaciones combinadas novedosas de
Ivermectina / Fluazurón en bovinos

Autor:
Diego Robaina

Fecha:



PEDECIBA

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Universidad de la República - Ministerio de Educación y Cultura

Equivalencia Terapéutica De La Administración Subcutánea De Ivermectina En El Control De *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* Mediante Formulaciones Combinadas Novedosas De Ivermectina / Fluazurón En Bovinos

Autor:

Diego Manuel Robaina Mandl (diegorobaina12@gmail.com)

Director(es) de la tesis:

Gonzalo Suárez Veirano (suarezveirano@gmail.com)

Silvana Alvariza (silvana.alvariza@gmail.com)

Palabras claves: Bioequivalencia, Farmacometría, Eficacia Garrapaticida, Asociaciones, Garrapata

Resumen

Las garrapatas del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* generan grandes impactos en la cadena productiva y en la sanidad de los animales. A nivel de mercado, existen numerosas alternativas farmacotécnicas para controlar dicha parasitosis. La presencia de formulaciones referencia (novedosas) y de copias o genéricas, deviene en la necesidad de contar con ensayos de bioequivalencia y equivalencia terapéutica que garanticen la intercambiabilidad entre productos comerciales. El objetivo general de la presente tesis de Maestría fue determinar la bioequivalencia y equivalencia terapéutica garrapaticida para ivermectina 1% luego de la administración subcutánea en forma única o en una formulación combinada con fluazuron 12,5% en bovinos. En el Capítulo I se demostró bioequivalencia para ivermectina, entre ambas formulaciones mediante el análisis no-compartimental y cálculo de los principales parámetros farmacocinéticos (AUC, Cmax y Cmax/AUC); finalizando con el ajuste del modelo compartimental para ivermectina en ambas formulaciones, dejando en claro el efecto de la formulación y preparación farmacéutica en los perfiles de concentración plasmática para ivermectina. El Capítulo II se centró en determinar la equivalencia terapéutica de la administración subcutánea de ivermectina (1%) formulada como monodroga o en combinación con fluazuron (12,5%) en bovinos naturalmente expuestos a garrapatas. El ensayo a campo permitió demostrar que el control a corto y mediano plazo (14 y 27 días post-administración) sobre garrapatas proporcionado por ivermectina en forma combinada no se vio afectado por las diferencias en las formulaciones, mientras que se pudo evidenciar un perfil de eficacia diferente entre las formulaciones combinadas al ser evaluadas a largo plazo (49 días post-administración). Los resultados alcanzados en la presente tesis, demuestran la necesidad e importancia de la complementariedad de los estudios de bioequivalencia y equivalencia terapéutica de formulaciones garrapaticidas combinadas de ivermectina y fluazuron.

Summary

Ticks of the genus *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* generate great impacts on the production chain and animal health. At market level, there are numerous pharmacological alternatives to control this parasite. The presence of reference formulations (novel) and of copies or generic ones, comes to the need of having bioequivalence and therapeutic equivalence tests that guarantee the interchangeability among commercial products. The general objective of this Master's thesis was to determine the bioequivalence and therapeutic equivalence of ivermectin 1% after the subcutaneous administration in unique form or in a formulation combined with fluazuron 12.5% in bovines. In Chapter I it was demonstrated bioequivalence for ivermectin, between both formulations by means of the noncompartmental analysis and calculation of the main pharmacokinetic parameters (AUC, Cmax and Cmax/AUC); finishing with the adjustment of the compartmental model for ivermectin in both formulations, leaving in clear the effect of the formulation and pharmaceutical preparation in the plasma concentration profiles for ivermectin. Chapter II focused on determining the therapeutic equivalence of subcutaneous administration of ivermectin (1%) formulated as monodrug or in combination with fluazuron (12.5%) in bovines naturally exposed to ticks. The field trial allowed demonstrating that the short- and medium-term control (14- and 27-days post-administration) on ticks provided by ivermectin in combined form was not affected by the differences in the formulations, while it was possible to evidence a different profile of effectiveness among the combined formulations when evaluated in the long term (49 days post-administration). The results reached in the present thesis, demonstrate the need and importance of the complementarity of the bioequivalence and therapeutic equivalence studies of combined ivermectin and fluazuron tick formulations.

Agradecimientos

A la Universidad de la República por el espacio y las herramientas para mi formación de grado y posgrado de forma gratuita

A la Facultad de Veterinaria por formarme como profesional y como persona.

A la Facultad de Ciencias y su programa de posgrado PEDECIBA por brindar la estructura administrativa y académica para mi maestría

A Gonzalo Suárez por el continuo apoyo, dedicación y estímulo para seguir adelante

A Silvana Alvariza por la paciencia, constancia y dedicación durante mi formación de posgrado

A los integrantes de la Unidad de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Veterinaria, compañeros del día a día, por el apoyo durante mi formación

A .:VLP:. por bancar y siempre estar

A PeCo por ser como és....

A mis padres, Betty y Carlos, por enseñarme a perseverar, no aflojar y estudiar, siempre estudiar.

A Miguel, mi hermano, que siempre tiene esa mirada y pensar tan justo y centrado.

A Eliana...mi langosta...la razón de todo.

Indice

Introducción y antecedentes	pag 6
Biología de la garrapata.....	pag 8
Antecedentes de la garrapata en Uruguay	pag 10
Modelo epidemiológico conceptual.....	pag 11
Estrategias de prevención y control de garrapatas en Uruguay	pag 12
Rol de las Lactonas Macrocíclicas en el control de <i>Rhipicephalus microplus</i>	pag 13
Eficacia de Ivermectina en el control de <i>Rhipicephalus microplus</i>	pag 17
Biodisponibilidad / Bioequivalencia y Equivalencia Terapéutica	pag 18
Hipótesis.....	pag 22
Objetivo general	pag 22
Objetivos específicos.....	pag 22
Metodología, Resultados y Discusión	pag 22
Capítulo I: Bioequivalencia de Ivermectina	pag 23
Capítulo II: Equivalencia Terapéutica	pag 34
Consideraciones finales y conclusiones	pag 41
Referencias bibliográficas	pag 44
Anexo 1: Determinación de parámetros farmacocinéticos	pag 50
Anexo 2: Producción científica y comunicación	pag 52

Introducción y antecedentes

Rhipicephalus (Boophilus) microplus, conocida como garrapata común del ganado, es la garrapata de mayor impacto económico (Benavides y Romero, 2001), debido a su amplia distribución, capacidad de vectorización, hábitos de succión de sangre y el número de ganado que afecta (Domínguez et al., 2016). Debido a su gran capacidad de adaptación y propagación, las garrapatas del género *Rhipicephalus* han podido propagarse en varias áreas geográficas del mundo. Aproximadamente 1.000 millones de bovinos se encuentran en zonas con riesgo de ser afectadas por estos parásitos (Rodríguez et al. 2011). Esto es particularmente importante cuando se trata de un hospedador de *Boophilus* spp. Las infestaciones incontroladas de las especies pertenecientes al subgénero *Boophilus* en condiciones climáticas favorables afectan gravemente al ganado europeo, mientras que estas especies tienen poco efecto en el ganado cebú. Las cargas elevadas de garrapatas pueden provocar un menor aumento de peso, pérdida de producción de leche y/o aborto. Este grupo de garrapatas afectan al 80% de la población de ganado mundial (Betancur y Giraldo-Rios, 2019). La presencia de la infestación por sí mismas, incluso cuando las garrapatas no transmiten ninguna enfermedad, pueden limitar la productividad del ganado europeo de *Bos taurus* hasta el punto de que hay que elegir entre renunciar al uso de ganado europeo acompañado o aplicar un control químico intensivo y costoso de las garrapatas, que además suele provocar rápidamente una resistencia contra los acaricidas utilizados (Jongejan y Uilenberg 2004).

En cuanto a la taxonomía, Camicas et al., (1998) y Horak et al., (2002) compilaron una lista completa de las garrapatas del mundo. En la actualidad se reconocen más de 900 especies de garrapatas, distribuidas en tres familias vivientes: Argasidae (>200 spp.), Ixodidae (>700 spp.) y Nuttalliellidae (1 sp.), así como una fósil, Deinocrotonidae (Guglielmone et al., 2010; Peñalver et al., 2017). Las garrapatas están clasificadas como la subclase Acari pertenecientes al orden Ixodida, del superorden Parasitiformes (Krantz y Walter, 2009; Nicholson et al., 2019). Los Ixodidae son conocidos como garrapatas duras por su placa dorsal esclerotizada, mientras que los Argasidae se denominan garrapatas blandas por su cutícula flexible y coriácea.

Económicamente, las especies de garrapatas del ganado más dañinas pertenecen a la familia Ixodidae, géneros *Rhipicephalus* y *Amblyomma*. Rodríguez y Leite (2013) estimaron que las pérdidas causadas por estas garrapatas en el ganado lechero de Minas Gerais (Brasil) equivalen a una reducción de 90,24 litros de leche/vaca/lactancia. Extrapolado al rebaño lechero nacional, las pérdidas serían de unos 922,36 millones de reales por año. Sobre las pérdidas económicas infligidas al ganado de producción de carne, Jonsson (2006) determinó que las pérdidas diarias eran de 1,18 y 1,37 gramos/garrapata/animal para el ganado cruzado y *B. taurus*, respectivamente. Rodriguez-Vivas et al. (2005) estimaron que el costo de las pérdidas de producción, la mortalidad, los daños a las pieles y el control de *R. microplus* y sus enfermedades transmitidas para México en 48 millones de dólares anuales. A nivel del territorio brasileiro, Molento (2020) estimó una pérdida anual de US\$ 3 billones debido al daño directo por estos parásitos, monto que asciende a US\$ 18 billones anuales si se consideran los costos asociados al tratamiento de patologías transmitidas por las garrapatas (Babesiosis y Anaplasmosis). Se estima que *R. microplus*, causa pérdidas económicas en el entorno de los 32,7 millones de dólares anuales, debidas a lesiones en los cueros, gastos por tratamientos, enfermedades transmitidas por la garrapata y gastos en las campañas de control (Avila, 1998).

Las enfermedades más importantes transmitidas por garrapatas, en particular en los rumiantes, son las babesiosis, las teileriosis, las anaplasmosis y la hidrocarditis. Los animales recuperados retienen la infección y permanecen inmunes durante largos períodos, a veces de por vida. En general, cuando esas enfermedades son endémicas, el ganado local ha estado expuesto a una larga selección natural y ha llegado a ser en diversos grados tolerante, pero no refractario a la infección. Además, los animales jóvenes suelen ser más tolerantes que los adultos. El número de garrapatas es importante, ya que la estabilidad endémica sólo puede alcanzarse cuando hay suficientes garrapatas infectadas para infectar a todos los animales mientras aún tienen su tolerancia asociada a la edad. Las condiciones climáticas son uno de los principales factores que influyen en el número de garrapatas; por lo tanto, la estabilidad endémica no se alcanza en las zonas que son climáticamente marginales para la especie de garrapata vectora (Jongejan y Uilenberg, 2004). Se estima que las pérdidas económicas causadas por la enfermedad en América Latina son de unos 800-875 millones de dólares cada año (Kocan et al., 2003).

Biología de la garrapata

Las garrapatas son artrópodos relativamente longevos. El ciclo de vida de todas las garrapatas duras (familia Ixodidae) consiste en el desove de huevos y desarrollo de tres etapas activas (larva, ninfa única y adulto), es un proceso de cambios morfológicos y fisiológicos en el mismo individuo. Las larvas y las ninfas se alimentan una vez, hasta la congestión, y luego realizan la muda a la siguiente fase. Las garrapatas de un solo hospedador, mudan dos veces en el mismo animal, de larva a ninfa y de ninfa a adulto. Después de lograr la ingurgitación completa, las hembras dejan su hospedador y ponen sus huevos en microambientes adecuados, como madrigueras, grietas u hojarasca. El número de huevos varía según la especie de garrapata y el grado de ingurgitación. La mayoría de las larvas de garrapatas ixódicas se alimentan durante un período de 3 a 6 días, las ninfas durante un período de 3 a 10 días y las hembras durante un período de 6 a 12 días. Las garrapatas ixodes tienen una movilidad limitada, por lo que el lugar de entrega de su anfitrión es de suma importancia (Núñez et al., 1985; Sonenshine y Roe, 2014a; 2014b).

En los climas tropicales, los ciclos de vida de las garrapatas de un solo hospedador *R. microplus* y *Dermacentor nitens* pueden durar tan sólo 8 semanas. En las altas temperaturas y humedad constantes de los trópicos, la preoviposición de *R. microplus* toma de 2 a 4 días en el verano, la oviposición requiere de 13 a 25 días, y en promedio los huevos se incuban durante 22 días. Para completar su vida no parasitaria (es decir, desde la caída de la hembra congestionada hasta la de las larvas activas), esta especie necesita un mínimo de aproximadamente 37 días. Este período puede extenderse hasta la duración de la vida larval (un promedio de 109 días) en la naturaleza, debido al tiempo necesario para que las larvas no alimentadas encuentren sus huéspedes. La vida parasitaria de *R. microplus* puede durar tan sólo 20,5 días independientemente de las condiciones climáticas (Núñez et al., 1985). Bajo condiciones climáticas favorables, esta especie de garrapata de un solo hospedador puede desarrollarse sin interrupciones y producir múltiples generaciones por año. La capacidad de permanecer inactiva en cualquier etapa particular del ciclo de vida de las garrapatas no alimentadas o alimentadas contribuye enormemente a la longevidad de su vida.

La adaptación morfológica más prominente utilizada para identificar un hospedador es el órgano de Haller. Este órgano contiene cápsulas con múltiples sensilios compuestos por

quimio y termorreceptores distantes. El órgano de Haller está situado en el lado dorsal del primer par de patas del tarso. En la posición de búsqueda, las garrapatas extienden el alcance del primer par de patas. El estímulo más fuerte para este comportamiento es el contacto directo con el hospedador. Esto promueve una reacción inmediata para unirse con sus garras (Apanaskevich y Oliver, 2014).

Específicamente, el ciclo biológico para *R. microplus* se compone de dos etapas, una etapa de vida libre la cual transcurre en el ambiente; y otra etapa de vida parasitaria sobre el hospedador (Fiel y Nari, 2013) la cual tiene una duración promedio de 21 días; siendo así un ciclo monofásico. El ciclo de vida libre comienza cuando la teleogina (hembra ingurgitada) se desprende del hospedador y cae al suelo. En condiciones óptimas (27 °C y más de 80% de humedad relativa) las garrapatas realizan toda la postura en 14 días (Fiel y Nari, 2013). Las teleoginas tienen un peso promedio de 0.24 g, estas tienen la capacidad de ovipositar una masa de huevos de la mitad de su peso, lo que equivale a 2000 huevos. Los huevos depositados en el ambiente, presentan un rango en el período de incubación de 15 días a 51 días (Nuñez et al., 1987). Transcurrido aproximadamente dos meses de la eclosión, la cantidad de larvas disponibles en las pasturas decrece significativamente, aunque en las condiciones de nuestro país pueden permanecer viables hasta seis meses. La muerte de las larvas se debe al agotamiento de sus reservas, al frío (heladas) y a la desecación (Cardozo et al., 1984), y, por esa razón, generalmente entre mayo y agosto, no encontramos garrapatas adultas en el ganado. Este periodo extra parasitario, de hasta 10 meses, es el que le permite a la garrapata sobrevivir al invierno.

El período comprendido entre el inicio y finalización de la ovipostura se le denomina ootoquia. En condiciones óptimas las garrapatas realizan toda la postura en 14 días (Fiel y Nari, 2013). Los huevos depositados en el ambiente presentan forma elíptica, miden aproximadamente 550 por 400 µm, son de color marrón oscuro y de superficie brillante, pegajosa, cubierta por una sustancia de aspecto albuminoide. Posteriormente, y en condiciones ideales, el porcentaje de eclosión logrado puede llegar al 85% o incluso valores superiores en donde emergen larvas viables. Una vez eclosionados los huevos emerge la larva de *R. microplus*, la cual tiene aproximadamente 500 µm de largo por 400 µm de ancho, de forma ligeramente ovoide y tres pares de patas; es de color ámbar, claro al principio y luego

se va oscureciendo, tomando finalmente un tono rojizo oscuro. Debido a que presenta un geotropismo negativo, suben por las pasturas formando conglomerados de larvas, lo que las protege de la desecación en espera de un hospedador.

Las larvas que llegan viables al mes de agosto (provenientes de la ovipostura realizada por hembras durante los meses de abril y mayo) suben a los animales y reinician un nuevo ciclo, estas se fijan a la piel a través del hipostoma, comenzando la hematofagia (en esta etapa es responsable de inocular al animal con la *Babesia bovis* en el caso de ser portadora) durante este estadio es casi imperceptible a simple vista. Seguido a esto ocurre la primera muda entre el día 3 y 4 del ciclo, tornándose en metalarva, días después muda nuevamente para adoptar el estadio de ninfa, donde se alimenta y crece siendo ahora visible al ojo humano. A los 13 días de comenzado el ciclo parasitario muda a metaninfa. Posteriormente a los 14 días, tiene lugar la última muda comenzando la etapa adulta donde se diferencian entre machos y hembras. La hembra adulta comienza denominándose neogina, la cual crece y pasa a llamarse partenogénica, esta aumenta su tamaño en un 80%, y en este momento es donde puede ocurrir la cópula; en el caso que esto no suceda, la garrapata permanece en este estadio y muere; por el contrario, si la cópula es realizada se continúa el ciclo parasitario, pasando ahora a tomar el nombre de teleogina, la cual se ingurgita completamente, llenándose de sangre del hospedador. Las primeras garrapatas ingurgitadas se observan a los 20,5 días del ciclo (entre 19 y 21 días). Antes de terminar el ciclo parasitario, la garrapata se ingurgita de sangre (ingiriendo entre 1 a 2 mL) en pocas horas. Luego se desprende en forma natural del bovino, lo que sucede fundamentalmente en las primeras horas de la mañana (Nuñez et al., 1987).

Antecedentes de la garrapata en Uruguay

En Uruguay, la garrapata común del ganado, *R. microplus*, es el ectoparásito más importante en bovinos y su combate ha sido reglamentado desde 1940. Lahille (1905) menciona su presencia para Fray Bentos, departamento de Río Negro. Wolffhügel (1916), la registra sobre bovinos, ovinos y equinos en 10 de los 19 departamentos. Cassamagnaghi (1923) menciona al perro como hospedador de *B. microplus*, pero otros autores lo denominan al perro como hospedador ocasional. Vogelsang (1928) señala a *B. microplus* como la garrapata más común de nuestro país y agrega al venado (*Cervus campestris*) (*Ozoteceros bezoarticus*

uruguayensis) como un nuevo hospedador a partir de un hallazgo en el departamento de Artigas.

En 1910 la ley 3606 crea a la Policía Sanitaria de los Animales, incluyendo a *R. microplus* como un problema zoonosario. La primera ley sobre erradicación de la garrapata (ley 9965) fue aprobada en 1940 y su decreto reglamentario en 1941; fue el punto de partida al combate contra la garrapata, llegando hasta nuestros días (Venzal et al., 2003).

Modelo epidemiológico conceptual

Entre los años 1975-1981, Nari y Cardozo realizaron estudios sobre la ecología del *R. 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. 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).

Una generación de garrapatas se define como el período transcurrido desde que una larva parasita al bovino, cae como adulto ingurgitado, oviposita, eclosionan larvas y vuelven a parasitar un bovino. En condiciones ideales de temperatura y humedad (27°C y más 80% HR) una generación se puede desarrollar en dos meses. La primera generación de garrapatas transcurre entre agosto y octubre; se genera a partir de las garrapatas caídas en el otoño. Sobre fines del invierno y principio de la primavera las condiciones climáticas son más favorables en relación al invierno, por lo que los ciclos se van acortando y la descendencia de las garrapatas que completan el ciclo parasitario es fértil y son las responsables de formar la segunda generación. Su desarrollo ocurre en noviembre a Diciembre principalmente; las poblaciones de garrapatas parasitando al bovino son mayores en relación a la primera generación, con promedio de 25 garrapatas por animal. A partir de la segunda, sigue la tercera generación, la que comienza a finales de verano y su máxima expresión se da durante los meses de otoño. Desde el punto de vista epidemiológico tiene suma importancia debida a que las garrapatas caídas, sus huevos, y las larvas superan las condiciones del invierno, y son las responsables de formar la primera generación de garrapatas de la siguiente temporada. Los estudios ecológicos llevados a cabo en el país determinaron que el ciclo de vida libre dura

como máximo entre 8 y 10 meses y el ciclo de vida parasitario 23 días (moda) presentando un rango de 20,5 a 42 días de duración (Fiel y Nari, 2013).

Estrategias de prevención y control de *R. microplus* en Uruguay

Hasta la fecha los tratamientos químicos han sido una herramienta de control accesible y eficaz, pero el tiempo medio desde la introducción de un nuevo acaricida hasta que desarrolla resistencia o se retira del mercado, es sólo de unos ocho años (Playford, 2005). Los principales métodos de control pueden clasificarse en métodos químicos (aplicación de productos acaricidas y reguladores del crecimiento de insectos) y métodos no químicos (aplicación de productos biológicos y control biológico). Entre ellos figuran la gestión de los pastos, la selección de animales resistentes, la inmunización activa mediante vacunas y el control biológico mediante enemigos naturales. Actualmente, los tratamientos químicos son casi el único recurso disponible que tienen los productores para el control de este parásito (Fiel y Nari, 2013). A partir de la década de los 80, el control de garrapatas se agravó por la aparición de resistencia a distintos grupos químicos de acaricidas. Entre 1960 y 1978 se usaron organofosforados, que luego de la aparición de los primeros casos de resistencia, fueron sustituidos por piretroides. En 1993, comienzan a aparecer los primeros casos de resistencia a piretroides que van siendo sustituidos por amidinas. Posteriormente en el 2006 se diagnosticó oficialmente resistencia a la molécula Fipronil (Fenilpirazoles) (Cuore et al., 2007), en 2009 al Amitraz (Amidinas) (Cuore et al., 2012) y en 2010 a Ivermectina (IVM) y Moxidectin (Lactonas Macroclínicas) (Cuore et al., 2015). Esto plantea una situación problemática de cara al control farmacológico de *R. microplus* en Uruguay (Miraballes y Riet-Correa, 2018). De los ingredientes activos aprobados para su uso en la campaña contra *R. microplus*, sólo para Fluzaron (FLU) (Benzoylurea), no se reportan informes de resistencia (Cuore et al., 2012). En este contexto, la aparición de resistencia trajo aparejados cambios en las estrategias de control parasitario, motivando aún más el uso racional de las herramientas farmacológicas disponibles. 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 principios activos.

La aparición de poblaciones de parásitos resistentes a los productos químicos utilizados para tratarlos, o el efecto adverso de los mecanismos de resistencia establecidos en las nuevas clases de productos químicos, sigue planteando una grave amenaza para las estrategias estables de gestión de los parásitos (Holdsworth et al., 2006). La resistencia del parásito se está convirtiendo en un problema global en vista que en la actualidad los tratamientos químicos casi son el único recurso disponible con el que cuentan los productores para el control de este parásito (Fiel y Nari, 2013). Entendemos como resistencia, la habilidad de una población de parásitos para tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal (susceptibles) de la misma especie (Cuore et al., 2006). Para no generar o intentar retrasar esta resistencia es importante conocer las diferentes generaciones y tratar cada una de ellas con un producto ectoparasitocida distinto. Conocer la resistencia a los químicos es importante para lograr un control o erradicación, para esto se usa lo que se conoce como tratamiento generacional, el cual se basa en el modelo epidemiológico, y propone la rotación de principios activos, utilizando uno diferente en cada generación de garrapatas. La resistencia a los parásitos es la consecuencia de una modificación genética o de un aumento de la frecuencia de expresión de un carácter hereditario. En ambos casos, se da a ciertos individuos de una población la capacidad de sobrevivir al efecto farmacológico de las concentraciones terapéuticas de un fármaco, en relación con la población normal (susceptible) de la misma especie (Stone, 1972; Nolan, 1990; Prichard, 1994). En el Uruguay, a nivel de control de poblaciones de *R. microplus* en el ganado y el fenómeno de la resistencia es preocupante.

Rol de las Lactonas Macrocíclicas en el control de *Rhipicephalus microplus*

El descubrimiento en el año 1980 de la avermectina, molécula con actividad antiparasitaria de amplio espectro, aislada a partir de los productos de la fermentación de la bacteria *Streptomyces avermitilis*, por los investigadores Campbell y Onura les mereció en el año 2015 la obtención del Premio Nobel de Medicina y dio lugar a la síntesis en 1981 de la IVM, lo que significó un gran avance en el tratamiento de las enfermedades parasitarias, incorporándose rápidamente a la terapéutica de dichas enfermedades (Laing et al., 2017).

Las avermectinas pertenecen a un grupo de antibióticos macrólidos derivados de los productos de fermentación de *S. avermitilis*, llamado Lactonas Macroclínicas (LM) Son un grupo de compuestos hidrofóbicos, que tienen espectro amplio hacia nematodos (Campbell y Benz, 1984) y artrópodos. El amplio espectro de actividad de la IVM, que incluye los ectoparásitos, sus excelentes márgenes de seguridad y su nuevo modo de acción produjeron, por sí solos, una contribución significativa a las opciones terapéuticas antiparasitarias del mundo disponibles para su uso por el médico veterinario. Sin embargo, fue la potencia sin precedentes de la IVM la que facilitó la producción de una amplia variedad de formulaciones orales, parenterales y tópicas para bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, caballos, bisontes, camellos, renos, perros, gatos y seres humanos, lo que la ha convertido en la droga antiparasitaria de mayor comercialización a nivel global en el mercado farmacéutico a nivel veterinario (Shoop y Soll, 2002).

La IVM fue la primera LM desarrollada para su uso en animales y revolucionó el control antiparasitario en los animales de producción, la quimioterapia contra la dirofilariosis canina y la quimioterapia antimalárica en los seres humanos. La IVM consta de dos homólogos estrechamente relacionados que contienen no menos del 80 % (22,23-dihidroavermectina B1 (H2B1a) y no más del 20 % (22,23-dihidroavermectina B1b (H2B1b)).

Egerton et al. (1981) fueron los primeros en detallar por titulación la extraordinaria potencia de IVM contra los nematodos en el ganado mediante administración oral y subcutánea. Tratamiento con 200 µg kg⁻¹ de IVM por vía oral o subcutánea eliminó más del 90 % de nematodos gastrointestinales inmaduros y maduros como el *Haemonchus placei*, *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus axei*, *T. colubriformis*, *Cooperia oncophora*, *C. punctata* y *Oesophagostomum radiatum*. Este estudio también mostró la eliminación de las etapas hipobióticas epidemiológicamente importantes de ciertos gusanos en el tracto intestinal también como actividad extraintestinal contra las lombrices de pulmón (*Dictyocaulus viviparus*).

Su mecanismo de acción tanto para artrópodos como para nemátodos es el incremento de la permeabilidad al cloro con hiperpolarización de las membranas y parálisis faríngea del parásito, lo que lo lleva a la muerte. Este efecto es mediado a través de canales de cloro ligados a glutamato (Arena et al., 1995; Cully et al., 1996). Estos receptores se expresan en

células musculares faríngeas y nerviosas de estos invertebrados y están ausentes en mamíferos, en los cuales la IVM puede actuar a nivel central a nivel de los receptores de ácido γ aminobutírico (GABA) pero con una afinidad 100 veces menor que por glutamato, lo que le otorga a este antiparasitario un satisfactorio margen de seguridad (Schaeffer y Haines, 1989).

Una vez disponible desde el espacio subcutáneo y accede a la circulación sistémica, su lipofilidad será clave para su patrón de distribución hacia los diferentes tejidos entre los que se incluyen los sitios donde se alojan los parásitos (mucosa abomasal e intestinal, tejido pulmonar y piel), en los cuales se alcanza niveles significativamente superiores a los reportados en el plasma sanguíneo, con el que guardan una estrecha correlación en sus perfiles de concentración. Su eliminación es principalmente por excreción biliar siendo también la glándula mamaria una vía de excreción relevante en hembras en lactación (Lanusse, 2009).

Las drogas endectocidas han sido reportadas como sustratos de bombas de eflujo como la glicoproteína-P (P-gp), estas proteínas se expresan constitutivamente en una variedad de tejidos como hígado, intestino, riñón, páncreas, barrera hematoencefálica (BHE), plexos coroideos, placenta, etc., evitando la acumulación intracelular y participando de los procesos de excreción, distribución y absorción cuando la administración se realiza por vía enteral (Staud et al., 2010). La importancia de la secreción intestinal mediada por P-gp ha sido demostrada como mecanismo de eliminación de IVM por Laffont y colaboradores en el año 2002 y posteriormente estudiada en profundidad por Lifschitz y colaboradores (Lanusse et al., 2018).

El perfil farmacocinético de la droga difiere según la vía de administración, la formulación y la especie animal. Tras la administración subcutánea (sc), las características de absorción y, por consiguiente, la farmacocinética de IVM se ven notablemente influidas por la formulación del producto (Jackson, 1989). Tras la administración parenteral, el depósito en el tejido subcutáneo favorece una absorción lenta desde el lugar de la inyección y proporciona una duración prolongada en el torrente sanguíneo. Como lo demostraron Lo et al. (1985), las características de absorción de esta droga antihelmíntica están marcadamente influenciadas por la formulación de la droga. En la preparación inyectable no acuosa (60% de propilenglicol y 40% de glicerol formal) (IVOMEC, Merck, Sharp y Dohme), IVM se

absorbe relativamente lento desde el lugar de la inyección. Una solución acuosa inyectable de IVM permite una absorción más rápida y una mayor concentración plasmática máxima de la droga (Lo et al., 1985). Sin embargo, después de la administración de IVM al ganado, se ha informado que la vida media de eliminación es tres veces más larga (8-13 días) cuando se administra en un vehículo no acuoso que en uno acuoso (Lo et al. 1985). Este resultado indica la influencia de la cinética de absorción en la disposición de IVM administrada por vía parenteral. Se ha demostrado que el tiempo medio de residencia es notablemente más largo después de la administración parenteral de IVM en bovinos (6,5 días) (Toutain et al., 1988), en comparación con la administración intravenosa del compuesto en la misma formulación (2,8 días; Wilkinson et al., 1985).

Las ligeras diferencias en la formulación explican los cambios en los perfiles plasmáticos y la exposición de los parásitos objetivo a las concentraciones activas de la droga. Esto ha sido confirmado por los prolongados tiempos de residencia de IVM en el plasma y los tejidos diana y la prolongada persistencia de su actividad antihelmíntica, tras la administración de una nueva formulación en base de aceite al ganado, en comparación con la preparación estándar (Lifschitz et al., 2004). La duración de los niveles efectivos de IVM en plasma es particularmente importante en el tratamiento de las infestaciones de garrapatas, ya que estos organismos pueden alimentarse durante períodos de varios días. El uso de la IVM en el tratamiento y el control de una amplia variedad de artrópodos parásitos del ganado ha sido objeto de numerosos ensayos, que sugieren que existen marcadas diferencias interespecíficas de susceptibilidad. Éstas probablemente reflejan diferencias en las pautas de alimentación de los parásitos, que pueden potenciar o impedir el contacto con la droga, más que diferencias inherentes en la sensibilidad a la IVM (Jackson, 1989). Todo lo anterior, otorga especial atención a los estudios de bioequivalencia en cuanto a responder si el fármaco se comporta de manera similar desde el punto de vista farmacocinético y si esa podría ser la razón de las diferencias en los estudios de eficacia. Lanusse et. al. (2018) afirmaron que la comprensión del comportamiento farmacocinético de los medicamentos antiparasitarios de amplio espectro y de los factores que modulan ese comportamiento son muy importantes para maximizar su eficacia clínica y retrasar el desarrollo de la farmacorresistencia.

Eficacia de Ivermectina en el control de *R. microplus*

La IVM ha sido el foco de estudio de eficacia por parte de numerosos autores debido a sus características farmacocinéticas y elevada potencia. La versatilidad de esta molécula y su alta eficacia llevó a un amplio uso en base a diferentes presentaciones comerciales. La presión de selección comenzó a manifestarse en la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes a IVM en diferentes áreas (Castro-Janer et al. 2011), por lo tanto, es esencial monitorear la distribución de sensibilidad buscando preservar la actividad de ciertos compuestos (Pereira, 2009).

Ensayos de eficacia han aportado datos sobre la capacidad de la IVM para el control de garrapatas *R. microplus* en bovinos. Pereira (2009) analizó la eficacia de tres lactonas macrocíclicas (IVM, doramectina y abamectina) tras infestación artificial; el tratamiento con IVM al 1% presentó valores de eficacia por encima del 80% hasta el día 21 post-administración. Resultados similares han sido reportados por Maske et al. (1992) con valores de eficacia entorno al 99% tras administración de IVM. Caproni et al. (1998) reportan valores similares para la reducción de presencia de garrapatas adultas en bovinos tras administración subcutánea de IVM, aunque no fueron tan alentadores. Los autores reportan un 83% de eficacia a los 12 post-administración, valor que se reduce a 63% tras 28 días de administrado el tratamiento. Davey et al. (2005) comparan la eficacia de IVM al 1% frente a infestación artificial con *R. microplus* en bovinos, reportando valores de eficacia del 99% para IVM. Estos valores de eficacia tan elevados responden a dos factores: sensibilidad de la cepa y estadio evolutivo de *R. microplus* siendo afectado. Estudios de persistencia realizados por Davey et al. (2005) reportan que los niveles plasmáticos de IVM tras una única dosis por vía subcutánea a una concentración de 1%, no aportan control en poblaciones de *R. microplus* tras una semana de administrado, cayendo por debajo de los niveles plasmáticos necesarios para el control de poblaciones de garrapatas en bovinos. Actualmente, las recomendaciones de aplicación de formulaciones de IVM 1% para mantener porcentajes de eficacia que garanticen el control o la erradicación de *R. microplus* en Uruguay establece una frecuencia de dosificación de 21 días (MGAP, 2020).

La implementación de formulaciones de depósito de IVM surge por la necesidad de prolongar los tiempos de redosificación manteniendo concentraciones plasmáticas efectivas, objetivo

que se logra aumentando el tiempo en que IVM se encuentra por encima del valor mínimo capaz de controlar poblaciones de *R. microplus*. El impacto de mantener concentraciones plasmáticas por encima del mínimo necesario para el control de parásitos fue planteado por diferentes autores (Davey et al., 2010; Lifschitz et al., 2016). La industria farmacéutica veterinaria desarrolló la IVM al 3.15 %, tixotrópica, formulación que una vez depositada en el tejido subcutáneo logra liberar IVM en forma lenta. Los niveles plasmáticos efectivos de IVM son relevantes para el control de garrapatas, siendo que estos parásitos pueden alimentarse durante varios días ingiriendo sangre del hospedador (Jackson, 1989). El perfil plasmático de IVM obtenido con estas formulaciones de depósito fue estudiado por Lifschitz et al. (2007) quienes demostraron una persistencia mayor para las formulaciones de IVM 3.15% en comparación con IVM 1 %, lo que podría tener efectos significativos en el control de parásitos y la posología necesaria para su control/erradicación. Davey et al. (2010) propuso un punto límite (8 ng/mL) para la concentración plasmática de IVM administrada en formulaciones de “larga acción” o “depósito”, por encima del cual existe eficacia frente a *R. microplus*. El impacto de mantener concentraciones de IVM por encima de 8 ng/mL fue demostrado por varios autores (Nolan et al., 1985; Pound et al., 1996; Miller et al., 1999).

Ensayos de eficacia para IVM 3.15 % tras administración subcutánea aportan resultados que avalan la premisa planteada por Lifschitz et al., en 2007 sobre la persistencia de acción en base al perfil plasmático. Nava et al. (2019) reportan perfiles de eficacia frente a infestaciones con *R. microplus* tras la administración de IVM 3.15 %; a partir del día 7 post-tratamiento y hasta el día 21 observaron porcentajes de eficacia cercanos al 100%. Estos resultados responden a un mayor tiempo de exposición de las garrapatas a concentraciones de IVM que son letales para el parásito, afectando diferentes estadios evolutivos que van surgiendo con el avance del ciclo biológico parasitario. Nava et al. (2019) lograron cuantificar la concentración plasmática de IVM tras administrar una formulación al 3.15 %, con valores superiores al límite mínimo capaz de controlar poblaciones de garrapatas de 8 ng/ mL establecida por Davey et al. (2010) a partir del día 5 post administración.

Biodisponibilidad / Bioequivalencia y Equivalencia Terapéutica

La administración de un medicamento a un paciente persigue siempre los objetivos de seguridad y eficacia, es decir ser efectivo en la prevención, mitigación o eliminación de una

enfermedad a la vez que se minimice la probabilidad de aparición de efectos adversos (Benet, 1984; Holford, 2006).

Ambos objetivos refieren a la respuesta farmacodinámica (PD) que provocará el fármaco contenido en dicho medicamento, determinada por un mecanismo específico de acción farmacológica que desencadenará efectos bioquímicos y fisiológicos para finalmente producir un resultado clínico observable (Holford, 2006). Esta respuesta farmacodinámica está condicionada por la concentración de fármaco presente a nivel de los tejidos o fluidos en los que se ubique el sitio de acción farmacológica, lo cual está a su vez condicionado por la respuesta farmacocinética del medicamento, es decir el perfil de concentraciones a nivel de los diferentes fluidos biológicos que surge como consecuencia de todos los procesos que ocurren desde el momento en que se hace ingresar un medicamento al organismo, su distribución hacia los diferentes tejidos, hasta que el mismo es eliminado ya sea por metabolismo o excreción (Benet, 1984). Cuando se utilizan concentraciones de drogas en la sangre para demostrar la bioequivalencia del producto, se asume que los productos que presentan una tasa y extensión de absorción "equivalentes" para una misma droga, serán equivalentes terapéuticos e intercambiables en un entorno clínico. Toutain y Koritz (1997) plantean que el realizar ensayos de bioequivalencia se asume que si dos formulaciones presentan velocidad y magnitud de absorción equivalentes, conducirán esencialmente a similares perfiles de concentración-tiempo de la droga en plasma y, por lo tanto, esencialmente a las mismas magnitudes de efectos, ya sean terapéuticos o tóxicos. La variabilidad en la interacción medicamento-organismo (respuesta PK/PD) en medicina veterinaria tiene un gran número de fuentes: especie, raza, sexo, edad, factores genéticos y medioambientales, el medicamento (fármaco, excipientes y tecnología de fabricación), entre otras.

La producción de nuevos medicamentos en base a nuevas moléculas requiere de años de investigación y la inversión de cuantiosas sumas de dinero, por lo que esta tarea es llevada adelante por empresas multinacionales de gran potencial económico. Estos productos innovadores una vez lanzados al mercado cuentan con Patentes que protegen la inversión realizada por las empresas por un tiempo razonable. Vencido este plazo, distintos laboratorios pueden competir en el mercado en la producción de estos medicamentos que llamamos

“similares” o “copias”. Este hecho es beneficioso dado que la presencia de alternativas al producto original provoca una disminución de precios aumentando así la accesibilidad a los medicamentos y beneficiándose la sociedad toda. Si bien se trata de productos conteniendo el mismo fármaco, los excipientes, el proceso y la tecnología de fabricación o incluso la forma farmacéutica serán probablemente diferentes, por lo cual ya desde mediados de la década de los 70 las agencias reguladoras en materia sanitaria como la FDA introdujeron los estudios de bioequivalencia como manera de asegurar que la aparición de estos productos competidores no pusiera en riesgo la seguridad y eficacia de los medicamentos disponibles en el mercado. Aquellos medicamentos que hayan sido sometidos a estudio y hayan demostrado Bioequivalencia con el producto original se denominan “medicamentos genéricos”.

Según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), se considera bioequivalentes a dos medicamentos que contienen el mismo ingrediente activo ya sea que se trate de equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuyas biodisponibilidades (cantidad y velocidad con la que al fármaco se hace disponible al organismo) luego de la administración en la misma dosis molar se encuentran dentro de límites predefinidos aceptables que han sido predefinidos con el fin garantizar un rendimiento in vivo comparable, es decir, similitud en términos de seguridad y eficacia (Guideline On The Investigation Of Bioequivalence, EMA, 2018)

La determinación de Bioequivalencia entre dos productos farmacéuticos involucra la realización de un ensayo clínico en el que se evalúa el cociente de valores medios de parámetros farmacocinéticos obtenidos en sujetos que conforman una muestra de la población, que reciben el medicamento similar (Test) y aquel que será tomado como Referencia (generalmente el original).

Un ensayo de bioequivalencia parte de la base que el efecto de la formulación pueda distinguirse de otros efectos. Se pueden plantear dos estructuras de diseño: cruzado o en paralelo. Al comparar dos formulaciones, se recomienda un ensayo de tipo “cruzado” (dosis única, aleatorizada, en dos períodos y en dos secuencias). En determinadas circunstancias, se podrían considerar diseños alternativos bien establecidos, como un diseño paralelo. Si bien el diseño experimental más adecuado para este tipo de ensayos es el cruzado y compensado,

de dos períodos y dos secuencias de administración, en la que cada sujeto recibe una dosis de cada una de las formulaciones a comparar, separadas por un período adecuado de “lavado” de fármaco (wash-out), con secuencias de administración (Referencia/Test y Test/Referencia) asignadas de manera aleatoria, en algunos casos, como el de esta investigación, este diseño no es posible de aplicar debido a los largo tiempos de permanencia del producto en el organismo. Estos estudios insumirían tiempos de ensayo tan prolongados que, factores asociados al paso del tiempo como por ejemplo la ganancia de peso, especialmente importante en especies productivas, introduciría gran variabilidad, dificultando arribar de ensayos concluyentes. Por este motivo es que se recurre a diseños en paralelo, en el que cada grupo conformado al azar recibe solo uno de los productos a evaluar.

Como se mencionó anteriormente, la biodisponibilidad refiere a velocidad y cantidad de fármaco que alcanza la circulación sistémica, por lo que los parámetros farmacocinéticos que se utilizan para llevar a cabo esta comparación son el Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas medidas desde tiempo cero a infinito ($AUC_{0-\infty}$), la concentración máxima alcanzado (C_{max}) y el tiempo al que se alcanza es concentración (T_{max}) luego de unas dosis únicas. La utilización del parámetro $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ ha sido propuesto también propuesto a modo de subrogar la velocidad de absorción, pero no es aceptado aun por ninguna legislación vigente. La metodología aplicada para el cálculo de los parámetros se encuentra en el Anexo 1.

Los conceptos de bioequivalencia pueden aplicarse a una comparación entre las vías de administración (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o utilizarse como herramienta para explorar las razones del fracaso terapéutico entre lotes de una formulación idéntica, para comparar la biodisponibilidad del producto entre especies animales o para detectar interacciones con alimentos u otros medicamentos (Steinijans y Hauschke, 1993). En medicina veterinaria los ensayos de bioequivalencia suelen formar parte de los procesos de registro, en donde se busca la vinculación de los datos de seguridad y eficacia asociados a un medicamento veterinario de referencia.

Hipótesis

Diferentes formulaciones de ivermectina administradas por vía subcutánea, en forma única o combinada con fluazuron en bovinos, pueden presentar diferencias en sus perfiles farmacocinéticos y por lo tanto alterar la respuesta terapéutica en el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Objetivo general

Determinar la bioequivalencia y equivalencia terapéutica garrapaticida para ivermectina luego de la administración subcutánea en forma única o en una formulación combinada con fluazuron en bovinos.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la bioequivalencia de ivermectina tras la administración subcutánea de dos formulaciones combinadas novedosas de ivermectina (1%) con fluazuron (12,5%) en bovinos.
- 2) Determinar la equivalencia terapéutica garrapaticida de la administración subcutánea de ivermectina (1%) formulada como monodroga o en forma combinada con fluazuron (12,5%) en bovinos naturalmente expuestos a garrapatas.

Metodología, Resultados y Discusión

El diseño experimental, los principales resultados obtenidos del proceso de investigación y la discusión de los aportes a la investigación en estudio se presentan en los capítulos I y II en formato de publicaciones científicas arbitradas (o en revisión).

La integración de los resultados y la discusión presentada, se realiza en el apartado Consideraciones finales y conclusiones.

CAPITULO I

Bioequivalencia De Ivermectina 1 % En Dos Formulaciones Novedosas Combinada Con Fluazurón 12,5% Para Administración Subcutánea En Bovinos

Alcance del Capítulo 1

- Establecer los parámetros farmacocinéticos primarios (AUC, Cmax, Tmax) para la administración combinada de ivermectina con fluazuron, mediante análisis no-compartmental.
- Determinar la bioequivalencia para la ivermectina administrada en dos formulaciones novedosas combinadas con fluazurón para la administración subcutánea en bovinos.
- Validar un modelo farmacocinético para ivermectina luego de la administración subcutánea de formulaciones farmacéuticamente equivalentes de Ivermectina/fluazuron en bovinos.



Bioequivalence of two novel formulations of ivermectin 1% combined with fluazuron 12.5% for subcutaneous administration in cattle

[Bioequivalencia de dos nuevas formulaciones de ivermectina al 1% combinada con fluazurón al 12,5% para administración subcutánea en bovinos]

Diego M. Robaina, Silvana Alvariza, Gonzalo Suárez*

Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario, Unidad de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Alberto Lasplaces 1620, Montevideo, Uruguay.

*E-mail: gsuarez@fvet.edu.uy; suarezveirano@gmail.com

Abstract

Context: Ivermectin (IVM) and fluazuron are present as novel combinations to control ticks. Differences in formulations account for changes to the plasma kinetics and could change exposure of target parasites to active drugs.

Aims: To evaluate bioequivalence for ivermectin administered by two novel formulations combined with fluazuron.

Methods: Twelve male Holstein calves were randomized into two groups (n=6), receiving a single subcutaneous dose of a novel formulation (A or B) of ivermectin combined with fluazuron (ivermectin 1% 0.2 mg/kg + fluazuron 12.5% 2.5 mg/kg). Blood samples were taken until 34 days after dosing. Non-compartmental analysis was applied for bioequivalence assessment. Compartmental analysis was carried out and model acceptance was validated using the visual predictive check graphics.

Results: Noncompartmental analysis shows that both formulations behaved similarly with C_{max} ratio of 0.982 (CI₉₀: 0.861 - 1.12, ANOVA test, p=0.814) and AUC₀₋₄ ratio of 1.01 (CI₉₀: 0.97 - 1.05, ANOVA, p=0.586) but at different T_{max} (1.4 ± 0.5 and 2.9 ± 1.2 days (Mann-Whitney U test, p=0.027) for A and B, respectively). The pharmacokinetic model has two compartments, linear elimination with first order absorption and formulation as covariable for the absorption rate.

Conclusions: We conclude that the two novel formulations combined of IVM 1% with fluazuron 12.5%, are bioequivalent for administration of IVM in cattle. This shows that carrying out bioequivalence studies are of great importance for understanding the potential interchangeability between formulations available in the pharmaceutical market.

Keywords: bioavailability; ectoparasites; pharmacometrics; ticks.

Resumen

Contexto: Ivermectina y fluazurón están presentes como combinaciones novedosas para controlar las garrapatas. Diferencias en las formulaciones explican los cambios en la cinética plasmática y modificarían la exposición de los parásitos objetivo a las drogas.

Objetivos: Evaluar la bioequivalencia de la ivermectina administrada mediante dos nuevas formulaciones combinadas con fluazurón.

Métodos: Se asignaron al azar doce terneros machos Holstein a dos grupos (n=6), que recibieron una única dosis subcutánea de una nueva formulación (A o B) de ivermectina combinada con fluazurón (ivermectina 1% 0,2 mg/kg + fluazurón 12,5% 2,5 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre hasta 34 días post dosificación. Se aplicaron análisis no-compartmental para evaluar la bioequivalencia. Se realizó análisis compartimentado y se validó la aceptación del modelo mediante gráficos de controles visuales predictivos.

Resultados: El análisis no-compartmental muestra que ambas formulaciones se comportaron de forma similar con relación C_{max} de 0,982 (CI₉₀: 0,861 - 1,12, prueba ANOVA, p=0,814) y relación AUC₀₋₄ de 1,01 (CI₉₀: 0,97 - 1,05, ANOVA, p=0,586), pero con diferentes T_{max} ($1,4 \pm 0,5$ y $2,9 \pm 1,2$ días (prueba U de Mann-Whitney, p=0,027) para A y B, respectivamente). El modelo farmacocinético tiene dos compartimentos, eliminación lineal, absorción de primer orden y la formulación como covariable para la tasa de absorción.

Conclusiones: Concluimos que las dos formulaciones combinadas de ivermectina 1% con fluazurón 12,5%, son bioequivalentes para ivermectina en bovinos. Esto demuestra que los estudios de bioequivalencia son de gran importancia para comprender la intercambiabilidad entre formulaciones disponibles en el mercado.

Palabras Clave: biodisponibilidad; ectoparasitos; farmacometría; garrapatas.

ARTICLE INFO

Received: October 6, 2020.

Received in revised form: October 13, 2020.

Accepted: October 13, 2020.

Available Online: October 24, 2020.



INTRODUCTION

Pharmacokinetic profile of a given drug differ according to administration route, formulation and animal species. After subcutaneous (s.c.) administration the absorption characteristics, and hence the pharmacokinetics of ivermectin are markedly influenced by drug formulation (Jackson, 1989). After parenteral administration, the deposition in s.c. tissue favors a slow absorption from the injection site and provides prolonged sustained levels of drug in the bloodstream. As demonstrated by Lo et al. (1985), the characteristics of absorption of ivermectin (IVM) drugs are markedly influenced by the drug formulation. In non-aqueous (60% propylene glycol and 40% glycerol formal) injectable preparation (IVOMEC, cattle, Merck, Sharp and Dohme), IVM is absorbed relatively slowly from the site of injection. An injectable aqueous solution of IVM allows faster absorption and higher peak plasma concentration of the drug (Lo et al., 1985). However, after s.c. administration of IVM to cattle, elimination half-life has been reported to be three times longer (8 - 13 days) when given in a non-aqueous vehicle than in an aqueous one (Lo et al., 1985). This result indicates the influence of the absorption kinetics on the disposition of parenterally administered IVM. The mean residence time has been shown to be markedly longer following parenteral administration of IVM in cattle (6.54 days) (Toutain et al., 1988), compared with the i.v. administration (2.8 days) of the compound in the same formulation (Wilkinson et al., 1985).

Slight differences between formulations can provoke changes in drug pharmacokinetics and thus different exposure of the target parasites to drug concentrations. This has been confirmed by the extended residence times of IVM in plasma and target tissues and the prolonged persistence of its anthelmintic activity, following the administration of a novel oil-based (IVM 1%) formulation to cattle, compared to the standard innovator preparation (Lifschitz et al., 2004). The duration of effective levels of ivermectin in the blood is particularly important in the treatment of tick infestations since

these organisms may feed over periods of several days. The use of ivermectin in the treatment and control of a wide variety of arthropod parasites of livestock has been the subject of a number of reviews, which suggest that marked interspecific differences in susceptibility exist. These probably reflect differences in parasite feeding patterns, which may enhance or prevent drug contact, rather than inherent differences in sensitivity to ivermectin (Jackson, 1989). All the aforementioned, grants special attention to bioequivalence studies to respond whether the drug behaves in a similar way from a pharmacokinetic point of view and if that could be the reason for differences in efficacy studies. Lanusse et al. (2018) stated that understanding the pharmacokinetic behaviour of broad-spectrum antiparasitic drugs and the factors modulating that behaviour is highly important for maximizing their clinical efficacy and delaying the development of drug resistance.

The aim of this study was to demonstrate IVM 1% bioequivalence between two novel formulations combined with fluazuron 12.5% for subcutaneous administration on cattle.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Twelve male Holstein calves (weighing 217 ± 7 kg) were randomized in parallel bioequivalence study into two groups ($n = 6$). The groups were aleatory identified as A and B and each group received a single dose of one or another of two novel formulations A (standard or reference) and B (test) of IVM combined with fluazuron (ivermectin 1% 0.2 mg/kg + fluazuron 12.5% 12.5 mg/kg) by subcutaneous route on the neck of the animals (both formulations have been approved as Animal Drugs Product from Ministerio de Agricultura y Pesca in Uruguay) (Table 1). Blood samples (10 mL) were collected from the jugular vein in heparinized tubes by disposable plastic syringe at 0, 0.3, 0.9, 1.3, 1.9, 2.3, 2.9, 3.3, 3.9, 4.3, 6, 9, 13, 27 and 34 days. Blood was centrifuged at 3500 rpm (10 min) and the plasma obtained was stored at -20°C

Table 1. Characteristics of the formulations A (standard or reference) and B (test) for ivermectin combined with fluzuron for use in cattle used in the study.

Formulation	Code	Ingredients	Dosage and route of administration	Pharmaceutical form	Indications
Standard or Reference	A	Ivermectin (1000 mg), fluzuron (12 500 mg) (API). Excipient q.s. (100 mL)	1.0 mL per 50 kg bodyweight, subcutaneous injection	Solution	Endectocide
Test	B	Ivermectin (1000 mg), fluzuron (12 500 mg) (API). Excipient q.s. (100 mL)	1.0 mL per 50 kg bodyweight, subcutaneous injection	Solution	Endectocide

The names of the manufacturers have been omitted for ethical reasons. API: active pharmaceutical ingredient. q.s.: quantity sufficient.

until analysis was performed. The experimental study was approved by the Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República, Uruguay (CHEA, No. 506-1493294137).

In order to optimizing the well-being of the animals enrolled in the clinical trial, frequent clinical health assessments were performed to identify animals that were potentially approaching a study end point. No animal reported any local (administration site) or systemic clinical signs or symptoms due to the administration of both formulations during the study.

Analytical procedures

IVM plasma concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC-FLD) method, based on the procedure developed by Lifschitz et al. (2004) with minor modifications.

Chemicals and reagents

All substances were obtained from Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, USA). Standards of ivermectin (IVM, product code: I8898) and abamectin (ABM, internal standard, product code: 31732), acetonitrile (product code: 34851), methanol (product code: 34860), n-methylimidazole (product code 336092) and trifluoroacetic acid (product code: 91707).

Drug extraction and derivatization

Briefly, plasma samples (1.0 mL) were spiked with 50 μ L of ABM. Acetonitrile (1 mL) and 0.25 mL of deionized water were added. After mixing for 20 min under a high speed vortexing shaker (DMT-2500 Multi-Tube Vortex Mixer, Miulab,

Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd., China), samples were centrifuged at 10.000 rpm for 10 min (Sorvall™ Legend™ Micro 17 microcentrifuges, Thermo Fisher Scientific, United States). The supernatant was transferred to a plastic tube previous to the solid extraction. The cartridges (Strata® C18-E 100 mg/1 mL) were previously activated with 2 mL of methanol and 2 mL of deionized water. The sample was passed through the cartridge using a manifold vacuum (HyperSep™ Glass Block Vacuum Manifolds, Thermo Fisher Scientific, United States) and then it was washed with 1 mL of deionized water and 1 mL of a mixture of deionized water:methanol (4:1); it was then let to dry for 5 min. A volume of 1.5 mL of methanol was used to elute the sample. The elute was evaporated to dryness under nitrogen flow (55°C/50 min). Derivatization was carried out using 100 μ L of a n-methylimidazole solution in acetonitrile (1:1) and 150 μ L of trifluoroacetic acid solution in acetonitrile (1:2). After completion of the reaction, 200 μ L of this solution was transferred to a HPLC vial and injected into the chromatographic system (Dionex UltiMate 3000 HPLC, Thermo Fisher Scientific, United States).

Calibration curves in the range between 0.5 - 5.0 and 5.0 - 80.0 ng/mL were established using least squares linear regression analysis and correlation coefficients (r) and coefficient of variation (CV) calculated. The lower limit of quantification (LLOQ) was defined as the lowest measured concentration with a CV < 20% an accuracy of $\pm$ 20% and an absolute recovery $\geq$ 70%. Concentration values below the 0.5 ng/mL (LLOQ) were not considered for the kinetic analysis of experimental data.

Chromatographic conditions

A Phenomenex®Luna C18 (5 m, 100°A, 150 mm × 4.6 mm, Phenomenex, reference code: 00F-4252-E0-BV) column was used as a reversed stationary phase. The mobile phase was a mixture of acetic acid 0.02%/methanol/acetonitrile (2/42/56) pumped at a flow rate of 1.5 mL/min. The column compartment was kept at 37°C. Fluorescence detection at an excitation wavelength of 361 nm and an emission wavelength of 463 nm.

Pharmacokinetic analysis

Noncompartmental analysis

Plasma concentration data were analysed using Pkanalix (PKanalix version 2019R2. Antony, France: Lixoft SAS, 2020) for a noncompartmental analysis. Pharmacokinetic parameters were reported as mean ± standard deviation (SD). The statistical analysis for establishing bioequivalence was performed using pharmacokinetic parameters by a one-way ANOVA test for C_{max} , AUC and C_{max}/AUC ; the Mann-Whitney U test was applied for T_{max} (R Core Team, 2020). Bioequivalence occurred whenever the 90% confidence intervals (90%CI) for a systemic exposure ratio fell entirely inside the equivalence range of 0.8 - 1.25 (Martinez et. al., 2002; FDA, 2016). In all cases, a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Compartmental analysis

IVM plasma concentration data was modeled using Monolix (Monolix version 2019R2. Antony, France: Lixoft SAS, 2020). Structural and statistical models were evaluated by basic goodness of fit plots, metrics value and visual predictive checks (VPC).

RESULTS

Non-compartmental approach

Fig. 1 depicts the plasma concentration of IVM for both formulations of IVM combined with fluazuron after subcutaneous administration (mean ± SD). The most relevant pharmacokinetic

parameters were calculated from a non-compartment analysis and the results are shown in Table 2.

Results show that both IVM formulations combined with fluazuron behaved in a similar way having similar C_{max} and AUC but at different times (T_{max}). Results for AUC and C_{max} were log transformed for statistical analysis (ANOVA test) to assess IVM bioequivalence between both formulations; the C_{max}/AUC coefficient was calculated for both formulation being a much more reliable indicator of absorption rate (Endrenyi et al., 1991), these data and the bioequivalence range the 90%CI are displayed in Table 3. T_{max} was depicted as a secondary bioequivalence parameter due to the fact that the sampling times were not equal and therefore the statistical analysis for T_{max} as a bioequivalence parameter described by Basson et al. (1996; 1998) could not be applied.

Area under the curve from time 0 extrapolated to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was not statistically different between formulations after ANOVA test on the log transformed data to assure normality ($p > 0.05$); no statistical difference was observed on any of the rest of the pharmacokinetic parameters obtained from the non-compartmental analysis of IVM.

Compartmental approach

IVM plasma concentration vs time data was modeled using Monolix (Monolix version 2019R2. Antony, France: Lixoft SAS, 2020. <http://lixoft.com/products/monolix/>). Parameter estimates, residual standard error (%) and visual predictive check graphs (VPC) were the applied criteria for the selection of the best fit. The PK model has a central compartment (volume V1), a peripheral compartment (volume V2, intercompartmental clearance Q), and a linear elimination (clearance Cl) with a first order absorption (rate constant k_a). Results for this model are presented in Table 4. Bioavailability (F) was fixed to 1 for the registered formulation (Formulation A). Model acceptance was validated using the VPC graphics comparing simulated data against the data obtained from the experiment (Fig. 2).

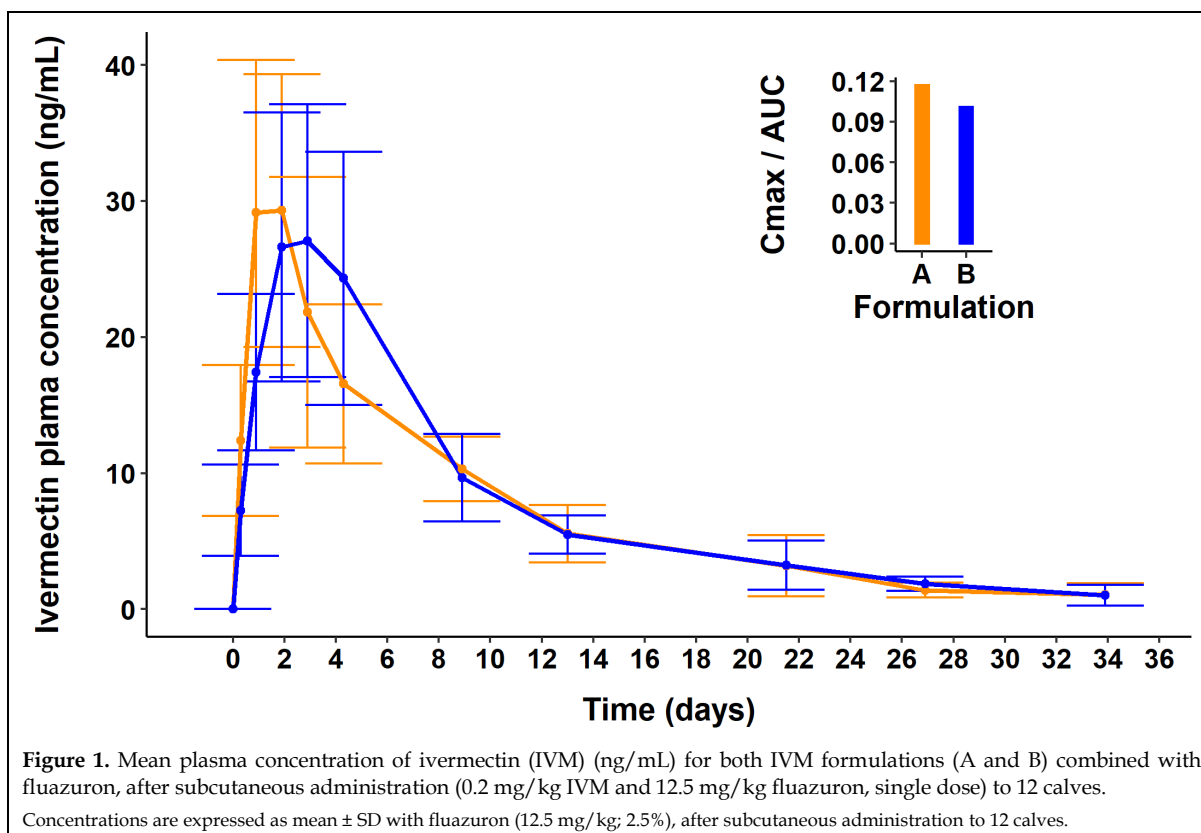


Table 2. Non-compartment parameters for ivermectin (0.2 mg/kg; 1%) in two different formulations (A and B) combined.

Pharmacokinetic parameter	A	B	p
AUC _{0-t} (ng/d)	246.8 $\pm$ 41.0	264.8 $\pm$ 52.8	0.526
AUC _{t-inf} (ng/d)	14.9 $\pm$ 9.3	16.8 $\pm$ 14.0	0.794
AUC _{0-inf} (ng/d)	261.7 $\pm$ 41.4	281.5 $\pm$ 44.4	0.442
Beta	0.1 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.03	0.734
t _{1/2} (d)	7.3 $\pm$ 2.0	8.2 $\pm$ 2.7	0.532
Vd (L)	1.74 $\pm$ 0.34	1.9 $\pm$ 0.83	0.682
Cl (L/d)	0.17 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.02	0.794
T _{max} (d)	1.4 $\pm$ 0.5*	2.9 $\pm$ 1.2	0.027
C _{max} (ng/mL)	30.9 $\pm$ 10.5	29.0 $\pm$ 9.8	0.749
MRT (d)	9.5 $\pm$ 3.0	10.7 $\pm$ 3.7	0.554

AUC_{0-t}: area under the concentration vs. time curve from 0 up to the limit of quantification; AUC_{t-inf}: area under the concentration vs. time curve from the limit of quantification up to infinity; AUC_{0-inf}: area under the concentration vs. time curve extrapolated to infinity; beta: slow elimination rate constant; T_{1/2el}: elimination half-life; Vd: volume of distribution; CL: clearance; T_{max}: time to peak plasma concentration; C_{max}: peak plasma concentration; MRT: medium retention time. *Differences between columns are statistically different at p<0.05, Mann-Whitney U-test.

Table 3. Bioequivalence for ivermectin between two formulations (formulation A and B) combined with fluazuron, after subcutaneous administration (0.2 mg/kg IVM and 12.5 mg/kg fluazuron, single dose) to 12 calves.

Pharmacokinetic parameter	Log transformed values		Ratio* ($\mu\text{B}/\mu\text{A}$) [90%CI]	P	Bioequivalence criteria
	Formulation A	Formulation B			
AUC _{0-t} (ng/d)	5.49	5.56	1.01 [0.974 - 1.05]	0.587	Pass
AUC _{0-inf} (ng/d)	5.55	5.63	1.01 [0.982 - 1.05]	0.451	Pass
C _{max} (ng/mL)	3.36	3.31	0.98 [0.861 - 1.12]	0.814	Pass
C _{max} /AUC _{0-inf}	0.61	0.59	0.96 [0.866 - 1.08]	0.620	Pass
T _{max} (d)	1.40	2.90		0.0274**	Fail

AUC_{0-t}: area under the concentration vs. time curve from 0 up to the limit of quantification; C_{max}: peak plasma concentration. Two pharmaceutical formulations are considered bioequivalent when the ratio $\mu\text{B}/\mu\text{A}$ confidence intervals (90%CI) for both AUC and C_{max} between formulation A and B result between 0.8 and 1.25 (Martinez et. al., 2002). **Compared using Mann-Whitney U-test. Significant statistical difference when $p < 0.05$.

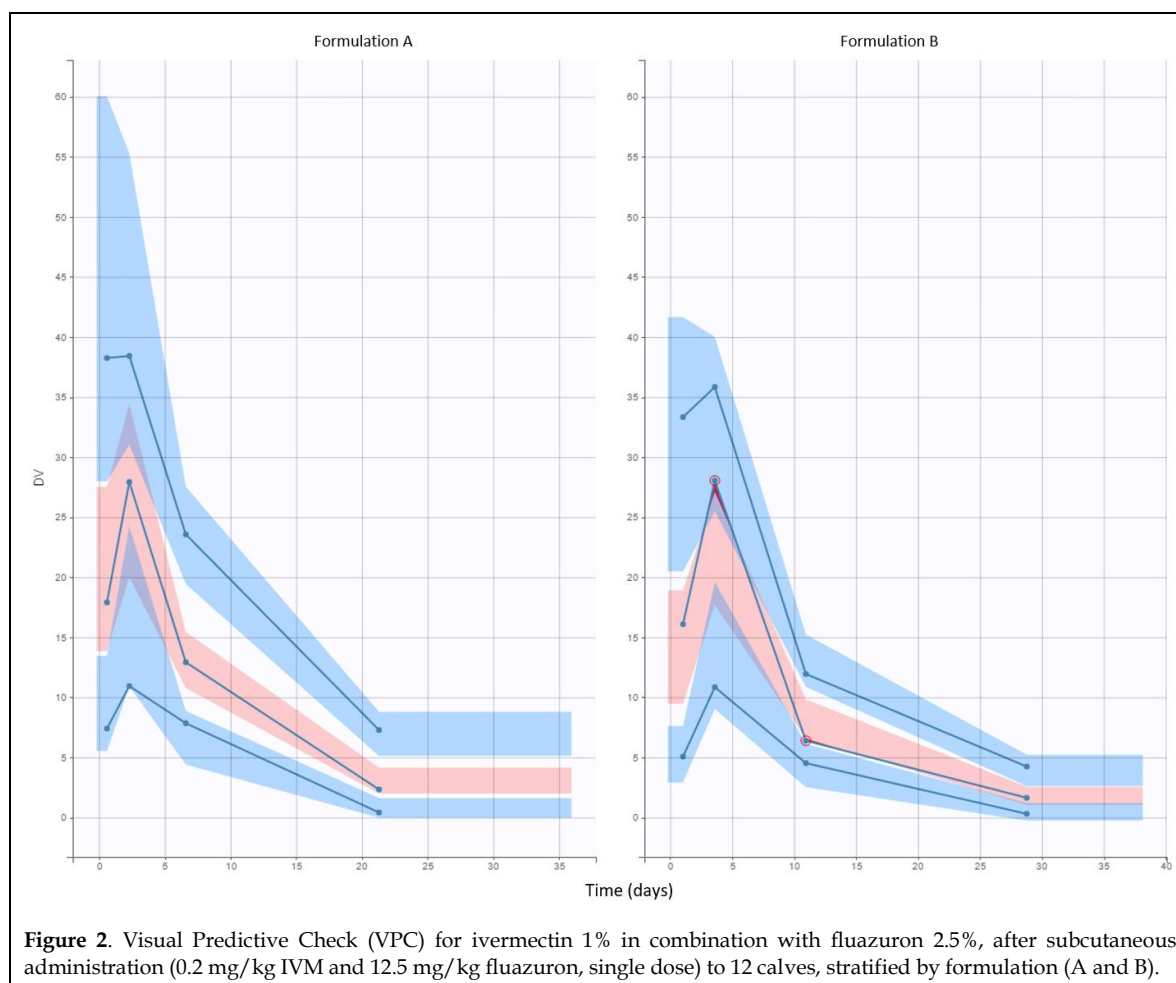


Table 4. Pharmacokinetic parameters estimate and residual standard error (%) for ivermectin (0.2 mg/kg; 1%) combined with fluzuron (12.5 mg/kg; 2.5%), after subcutaneous administration to 12 calves.

Pharmacokinetic parameter	Estimate	R.S.E.(%)
ka (d)	1.55	16.0
beta_ka_B	-0.932	22.8
Cl (L/d)	158	5.5
V1 (L)	1110	17.2
Q (L/d)	48.9	34.2
V2 (L)	566	49.3
F_pop	1	
Standard deviation of the random effects		
omega_V1 (L)	0.485	21.5
Error model parameters		
A	0.639	24.7
B	0.16	14.4

ka: absorption rate constant; beta_Ka_B: covariate of formulation B on absorption rate constant; Cl: clearance; V1: volume of distribution for the central compartment; Q: intercompartmental clearance; V2: volume of distribution for the peripheral compartment; F_pop: population bioavailability (fixed to 1); omega_V1: random effect for V1.

DISCUSSION

In Uruguay, according to official data, the number of available veterinary formulations containing IVM for the control of ticks in cattle rises to nine different IVM 1% and twenty-seven IVM 3.15% formulations for use in veterinary medicine (MGAP, 2020). The lack of information on the pharmacokinetic profile for IVM between formulations, and of the differences on manufacturing and quality of ingredients, becomes problematic when it comes to interchangeability of pharmaceutical products for the control of cattle ticks.

The pharmacokinetic profiles of IVM in cattle (Lo et al., 1985) and ewes (Suarez et. al., 2013) have been shown to be substantially affected by the composition of the administered formulation. The comparative plasma disposition applying non-compartmental analysis of IVM reported in these studies were evaluated after subcutaneous or oral administration on cattle and sheep, respectively. The best fitted pharmacokinetic model was adjusted and the final decision was based on parameters

estimates and residual standard error (%). McKellar and Gokbulut (2012) expresses that differences in body condition, breed, gender, feeding, and parasitism substantially affect the plasma disposition kinetics of macrocyclic lactones, therefore the current study was conducted using cattle with similar characteristics, uniformly distributed among experimental groups and free of tick infestation. This becomes of great importance when conducting parallel designs, since the experimental design has a lower power than cross-over design for bioavailability (Toutain and Koritz, 1997).

Avermectins and milbemycins are highly lipophilic substances that are extensively distributed from the bloodstream to different tissues. The extensive tissue distribution of the endectocide compounds in cattle agrees with the Vd values obtained in the current study (1800 - 1914 L for A and B formulations, respectively). Distribution into adipose tissue, particularly in liver and fat may account for the large Vd obtained for these com-

pounds compared to other antiparasitic drugs. Lanusse et al. (1997) stated that the persistence of the broad-spectrum antiparasitic activity of endectocide compounds relies on their disposition kinetics and pattern of plasma/tissues exchange in the host, where slight modifications to their plasma/tissue exchange pattern and/or disposition kinetics may result in substantial changes in their concentration and residence time at the site of parasite location which, in turn, would alter the potency and persistence of their antiparasitic activity. Taking this into account, bioequivalence study becomes more and more important as to understand any major changes in the pharmacokinetic behavior of any drug when administered in different formulations (Martinez et al., 2002). There were no statistically significant differences in AUC and C_{max} between both formulations under study, and only T_{max} showed statistical difference ($p < 0.05$). T_{max} for formulation B was 103% longer compared with that for formulation A; these results imply a slower absorption rate constant for formulation B after s.c. administration on cattle. The difference in T_{max} between both products may be due to differences in the manufacturing process.

The difference observed may not affect the efficacy/persistence of the antiparasitic activity against most susceptible strains of target endo- and ectoparasites, but differences in the activity against the dose-limiting parasites are likely to occur (Lifschitz et al., 2004). Being that there was no significant statistical difference between medium retention time (MRT, $p < 0.05$) between formulation A and B, it is correct to assume a similar persistence for ivermectin and hence achieving drug concentrations in the different target tissues, where the sustained attainment of drug levels toxic to the parasites is critical for the resultant efficacy (Lifschitz et al., 2004). Suarez et al. (2013) conducted relative bioavailability studies for IVM under three different formulations for oral administration on lambs, and the effect on nematodes control. The pharmacokinetic profile for IVM showed no statistical difference between the three formulations, with differences on the impact on endoparasites.

Among the parameters considered for bioequivalence studies, Endrenyi et al. (1991) stated that C_{max}/AUC is the most reliable for the study of the absorption rate between different formulations. This is due to the fact that the C_{max}/AUC ratio is independent of the amount of absorbed drug and is also independent of the intrasubject variability. In this scenario, both formulations showed no statistical difference ($p < 0.05$) indicating that there was no difference between the absorption rate for ivermectin between the formulations under study; thus we are thrown to believe that both formulations would behave in a similar way in a scenario of animals with different burdens of parasites (both internal and external). This last statement would need to be verified by field trials, using both formulations under similar conditions.

IVM (200 µg/kg, 1%) pharmacokinetic behavior on cattle after subcutaneous administration in combination with Fluazuron (12.5 mg/kg, 2.5%) was modeled using Monolix (2019R2), adjusting a two-compartmental model with first order elimination (Cl), an absorption constant (k_a) and an inter-compartment transfer constant (Q). The result for this model showed that the only covariate needed to be applied was the formulation effect on k_a . As reported by Lo et al. (1985), the pharmacokinetic profile of IVM is greatly affected by the differences in formulations. The absorption rate (k_a) for formulation A is 2.5 times faster compared to that of formulation B (4.7/d and 1.8/d, respectively) indicating that there is a great difference between the speed in which IVM ingress to the central compartment between both formulations, with the possible differences on the efficacy for the treatment of different parasites (both internal and external). The formulation was only relevant for the absorption rate constant while there was no effect on the rest of the pharmacokinetic parameters. The clinical impact of this difference is yet to be assessed by field trials on cattle infected by different parasite populations.

Lifschitz et al. (2004) compared pharmacokinetic parameters for doramectin and IVM in cattle using 42 animals divided into 6 groups ($n = 7$) for testing six endectocide formulations (doramectin, abamectin and four IVM formulations available on

the market), measuring plasma concentrations up until 35 days (840 hours) after the start of the experiment. The results for the bioequivalence between the four IVM formulations were similar to those obtained in our experiment, with AUC, $C_{\max}$ and $T_{\max}$ showing differences among the four IVM formulations. The AUC value found in our experiment does not differ from the ones reported by Lifshitz et al. (2004), where they reported an AUC varying from 242 ± 40.1 up to 308 ± 41.8 (ng day/mL) for the four different IVM formulations, while we obtained AUC for both formulations to be 246.8 ± 41.0 and 264.8 ± 52.8 ng/d (A and B respectively); $T_{\max}$ and $C_{\max}$ follow the same pattern, showing differences not only between the formulations tested by Lifshitz et al. (2004), but also when compared to the ones we obtained in our experiment. The cited authors reported a $C_{\max}$ ranging from 22.0 ± 6.86 up to 32.7 ± 4.35 ng/mL while we obtained a $C_{\max}$ of 30.9 ± 10.5 and 29.0 ± 9.8 ng/mL (A and B formulations respectively); for $T_{\max}$, the reported values by the mentioned authors ranges from 1.14 ± 0.38 up to 4.29 ± 2.06 days; we obtained a $T_{\max}$ of 1.4 ± 0.5 and 2.9 ± 1.2 days (A and B formulations respectively). The similarity in the differences between the four formulations tested by Lifshitz et al. (2004), and the two formulations tested in our experiment serves only to enforce the importance of conducting bioequivalence studies to characterize the different formulations available on the market for the treatment of cattle parasites.

Study limitations

To improve the pharmacokinetic model construction, samples at closer times intervals are needed to better understand the absorption phase.

CONCLUSIONS

We conclude that the two novel formulations combined of IVM 1% with fluazuron 12.5%, are bioequivalent for administration of IVM in cattle. This shows that carrying out bioequivalence studies are of great importance for understanding the potential interchangeability between formulations available in the pharmaceutical market. Further studies would be needed to evaluate the comple-

mentarity between both compounds (IVM and fluazuron) as well as the clinical impact of the pharmacokinetic profiles in cattle infected with parasites.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The selection of the approved formulations did not respond to any particular interest to compare the quality among them.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Facultad de Veterinaria, Universidad de la República for allowing this trial to be carried out. This study was funded by FUNDACIBA (Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Básicas, Montevideo, Uruguay) - Donation 201712033056.

REFERENCES

- Basson R, Cerimele B, DeSante K, Howey D (1996) $T_{\max}$: An unconfounded metric for rate of absorption in single dose bioequivalence studies. *Pharm Res* 13: 324–328.
- Basson R, Ghosh A, Cerimele B, DeSante K, Howey D (1998) Why rate of absorption inferences in single dose bioequivalence studies are often inappropriate. *Pharm Res* 15: 276–279.
- Endrenyi L, Fritsch S, Yan W (1991) $C_{\max}$ /AUC is a clearer measure than $C_{\max}$ for absorption rates in investigation of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 29 (10): 394–399.
- FDA/CVM GFI #224 (VICH GL52) (2016) Bioequivalence: Blood level bioequivalence study, 2016 <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cvm-gfi-224-vich-gl52-bioequivalence-blood-level-bioequivalence-study> [Consulted September 15, 2020].
- Jackson H (1989) Ivermectin as a systemic insecticide. *Parasitol Today* 5: 146–155.
- Lanusse C, Lifshitz A, Virkel G, Alvarez L, Sánchez S, Sutra J, Galtier P, Alvinerie M (1997) Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 20: 91–99.
- Lanusse C, Canton C, Virkel G, Alvarez L, Costa-Junior L, Lifshitz A (2018) Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. *Trends Parasitol* 34 (8): 664–682.
- Lifshitz A, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, Jauregui Lorda J, Lanusse C (2004) Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. *Vet Parasitol* 119: 247–257.
- Lo P, Fink D, Williams J, Blodinger J (1985) Pharmacokinetics studies of ivermectin: effect of formulation. *Vet Res Commun* 9: 251–268.

- Martinez M, Langston C, Martin T, Conner D (2002) Challenges associated with the evaluation of veterinary product bioequivalence: an AAVPT perspective. *J Vet Pharmacol Ther* 25(3): 201–220.
- McKellar Q, Gokbulut C (2012) Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol* 13: 888–911.
- MGAP (2020) Listado de garrapaticidas. (n.d.). Retrieved October 02, 2020, from <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/listado-garrapaticidas-0> [Consulted October 02, 2020]
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Suarez G, Alvarez L, Castells D, Correa O, Fagiolino P, Lanusse C (2013) Relative bioavailability and comparative clinical efficacy of different ivermectin oral formulations in lambs. *BMC Vet Res* 9(1): 27.
- Toutain P, Koritz G (1997) Veterinary drug bioequivalence determination. *J Vet Pharmacol Ther* 20: 79–90
- Toutain P, Campan M, Galtier P, Alvinerie M (1988) Kinetic and insecticidal properties of ivermectin residues in the milk of 22 dairy cows. *J Vet Pharmacol Ther* 11: 288–291.
- Wilkinson P, Pope D, Baylis F (1985) Pharmacokinetics of ivermectin administered intravenously to cattle. *J Pharm Sci* 74: 1105–1107.

AUTHOR CONTRIBUTION:

Contribution	Robaina D	Alvariza S	Suárez G
Concepts or ideas	x		x
Design	x	x	x
Definition of intellectual content	x	x	x
Literature search	x		
Experimental studies	x		
Clinical trial	x		x
Data acquisition	x		
Data analysis	x	x	x
Statistical analysis	x	x	x
Manuscript preparation	x		
Manuscript editing	x		x
Manuscript review	x	x	x

Citation Format: Robaina D, Alvariza S, Suárez G (2021) Bioequivalence of two novel formulations of ivermectin 1% combined with fluazuron 12.5% for subcutaneous administration in cattle. *J Pharm Pharmacogn Res* 9(1): 88–97.

CAPÍTULO II

Equivalencia Terapéutica De Ivermectina 1% Y Dos Formulaciones Novedosas Combinadas De Ivermectina 1% + Fluazurón 12,5% Para El Control De *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* En Uruguay

Alcance del Capítulo II

- Evaluar la eficacia y persistencia garrapaticida de la aplicación a dosis única de ivermectina al 1% administrada por vía subcutánea a 0,2 mg/kg en el control de *R. microplus* en bovinos naturalmente infectados.
- Determinar la equivalencia terapéutica de la estrategia de control mediante la aplicación a dosis única de dos formulaciones combinadas de ivermectina 1% y fluazurón 12,5% para el control de *R. microplus* a campo en Uruguay.

Submitted: 16/12/2020

Accepted: 29/01/2021

Published: 25/02/2021

Therapeutic equivalence of ivermectin 1% and two novel formulations combined of ivermectin 1% + fluazuron 12.5% for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in beef cattle from Uruguay

Diego Robaina, Silvana Alvariza and Gonzalo Suárez*

Pharmacology and Therapeutics Unit, Department of Clinics, Veterinary Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

Abstract

Background: Novel combinations of ivermectin (IVM) and fluazuron (FLU) are presented as an alternative for the control of ticks in cattle. Applying a combination of drugs with the aim to affect different stages of the parasite's life cycle is established as a potential measure to achieve the control of ticks in cattle.

Aim: To determine the therapeutic equivalence between two novel formulations of IVM 1% combined with FLU 12.5% tested on bovines naturally infested with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Methods: Forty adult beef cattle were randomized into four groups ($n = 10$): IVM [1% (0.2 mg/kg)], combinations groups A and B [IVM 1% (0.2 mg/kg) + FLU 12.5% (2.5 mg/kg), each], and control [untreated]. On days 14, 27, and 49 after administration, the presence of ticks was ranked as null, low, medium, and high; a cumulative link model was adjusted to evaluate treatment response.

Results: Although all groups had some animals with the presence of ticks until day 27, on day 14 IVM [odds ratios (OR) 0.013, CI95%: 0.001–0.014, $p < 0.01$], A (OR 0.01, CI95%: 0.00–0.07, $p < 0.01$) and B (OR 0.01, CI95%: 0.00–0.148, $p < 0.01$) groups were different when compared to the control group, unlike on day 27 where only groups A (OR 0.02, CI95%: 0.00–0.17, $p < 0.01$) and B (OR 0.06, CI95%: 0.00–0.46, $p < 0.01$) remained different from the control group. On day 49 post-administration, IVM and B did not differ from the control group, with 0.95 probability (CI95% 0.92–1.02) of high parasite burden. At day 49 post-administration, group A was the only group free of ticks (OR 0.01, CI95%: 0.00–0.13, $p < 0.01$).

Conclusions: Pharmacotechnical differences in combined formulations should be considered in therapeutic equivalence studies.

Keywords: Bovine, Drug combination, Ectoparasites, Tick.

Introduction

In livestock systems, parasitic disease is one of the health problems that causes the greatest economic losses (Wolstenholme *et al.*, 2004; Waller, 2006). Ticks are one of the most destructive ectoparasites of livestock in tropical and subtropical areas. They are responsible for severe economic losses through both the direct effects of blood feeding and indirectly as vectors of pathogens (Eckstein *et al.*, 2015; Molento, 2020).

Multiple treatments and strategies have been implemented all around the world when it comes to achieving the control or eradication of *Rhipicephalus microplus* on field conditions, using different drugs under different formulations applied by different routes, enhancing the fact that there is no unique way to treat *R. microplus*, and making it necessary to adapt the strategy for the different epidemiological situation and risks (Sutherst *et al.*, 1979; George *et al.*, 2004; Ahmed, 2016; Rodriguez-Vivas *et al.*, 2018).

In Uruguay, the level of control of *R. microplus* populations in cattle and the resistance phenomenon are worrying. The main control methods can be classified into chemical methods (application of acaricidal products and insect growth regulators) and non-chemical methods (application of biological products and biological control). Currently, chemical treatments are almost the only available resource for the control of this parasite (Fiel and Nari, 2013). The emergence of parasite populations resistant to chemicals used to treat them, or the resistance mechanisms on new chemical classes, continues to pose a serious threat to stable chemical parasite management strategies (Holdsworth *et al.*, 2006). The first diagnosis of resistance to synthetic pyrethroids in Uruguay was reported in 1994 (Cardozo *et al.*, 1984; Fiel and Nari, 2013). Subsequently in 2006, resistance to the molecule fipronil (Phenylpyrazoles) was officially diagnosed (Cuore *et al.*, 2007), in 2009 to amitraz (Amidines)

*Corresponding Author: Gonzalo Suárez. Unidad de Farmacología y Terapéutica, Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Email: suarezveirano@gmail.com

(Cuore *et al.*, 2012), and in 2010 to the macrocyclic lactones ivermectin (IVM) and moxidectin (Cuore *et al.*, 2015). Of the active ingredients approved for use in the campaign against *R. microplus*, only fluzaron (FLU) (benzoylurea) has no resistance reports in our country (Cuore *et al.*, 2017). New studies confirm an aggravation of the problem, with different parasitic populations involved in resistance to different active ingredients (Cuore *et al.*, 2016).

In this context, the increasing resistance to treatment procedures calls for changes in the existing parasite control strategies (Waller, 2006; Molento *et al.* 2011; Molento, 2020), further motivating the rational use of available pharmacological tools. Parasitic drug resistance is the consequence of a genetic modification or an increase in the frequency of expression of a hereditary character. In both cases, certain individuals in a population are given the ability to survive the pharmacological effect of therapeutic concentrations of a drug, in relation to the normal (susceptible) population of the same species (Stone, 1972; Nolan, 1990; Prichard, 1994). The strategic application of effective drugs with different mechanisms of action (i.e., non-neurotoxic drugs along with neurotoxic drugs), adjusted to the prevailing epidemiological conditions for ticks, is one of the possible alternatives when there is resistance to the main groups available. Combining drugs with different mechanisms of actions and effects on different stages of *R. microplus*' life cycle is an alternative for the strategic control of this parasite on cattle (Gomes *et al.* 2015).

The aim of this study was to determine therapeutic equivalence between two novel formulations of IVM 1% combined with FLU 12.5% tested on bovines naturally infested with *R. (Boophilus) microplus* on beef cattle under field conditions in Uruguay.

Materials and Methods

Farm location

The experiment was conducted from January to March 2019 in a farm located in Tacuarembó, Uruguay, South America (31°44'0"South, 55°59'0"West). This farm has a history of using IVM, fipronil, or amitraz for the control of *R. microplus*, but has never applied FLU in the rotation between the three drugs mentioned earlier.

Experimental design

Forty adult beef cattle (Aberdeen Angus) with a high degree of *R. microplus* infestation were randomized into four different groups ($n = 10$). The groups were as follows: IVM (IVM 1%, SC, IVOMECS®, Boehringer Ingelheim, Mexico); A (Formulation A; IVM 1% [0.2 mg/kg] + FLU 12.5% [2.5 mg/kg], subcutaneous administration (SC)); B (Formulation B; IVM 1% [0.2 mg/kg] + FLU 12.5% [2.5 mg/kg], SC); and control (untreated tracer bovines, as true indicators of tick populations in the field). Groups A and B and IVM received treatments on day 0 via a single dose through SC injection in the neck, following the recommendations

stated by the manufacturer. The dose was not repeated at any moment. All formulations have been approved as Animal Drugs Product from Ministerio de Agricultura y Pesca in Uruguay. Commercial names of both formulations A and B have been omitted for ethical reasons. All animals were kept in the same pasture during the entire experiment.

Data recovery

Animals were checked for the presence of ticks on the day of administration (day 0) and follow-up was carried out on days 14, 27, and 49 after administration. On each day mentioned, the number of adult engorged female ticks (EFT) (4.5–5 mm of diameter) was estimated by manually counting the number of engorged females on four body zones: perianal, flank, neck, and face, as recommended by the WAAVP (Holdsworth *et al.*, 2006). Four ranks were built in view of the presence of EFT: null (no presence of EFT), low (1–50) (less than 50 EFT), medium (50–100) (between 50 and 100 EFT), and high (>100) (more than 100 EFT). The trial ended on day 49 after the administration due to the explicit request from the owner of the farm to retake the usual strategy for the control of *R. microplus*.

Since we had three different treatments to compare with, at different time periods, we decided to evaluate the presence of EFT in the animals into three time periods according to the duration of the tick's parasitic cycle (mode = 23 days) (Fiel and Nari, 2013): early response (treatment response on day 14 post-treatment), late response (treatment response on day 27 post-treatment), and delayed response (treatment response on day 49 post-administration).

Statistical analysis

In every period, we compared all treatments against the control group. Ranked data [null, low (1–50), medium (50–100), and high (>100)] as the outcome variables were analyzed by cumulative link models (*clm*) for ordinal data using the *ordinal* package for R Statistical Software (version 4.0.3 [2020-10-10]) (R Studio Core Team, 2020). The best-fitted *clm* was selected by the goodness of fit criteria and AIC. The final model represents the presence of adult *R. microplus* for each treatment applied on cattle in different time periods; time (days) was handled as a continuous variable and group as a categorical variable (control, IVM, A, and B). Estimated odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) over cut-offs of the outcome scale were calculated. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

Ethical approval

The present study was approved by the Comisión Ética en Uso de Animales (CEUA) of Facultad de Veterinaria-Universidad de la República, under protocol No. CEUA FVET-PI 506/17.

Results

No adverse effects or signs of systemic intoxication were observed in the experimental animals after the

administration of treatments. Moreover, no cattle died and no concomitant medications were administered during these experiments.

Distribution of the presence of EFT found on each day for each treatment is shown in Figure 1. Data are expressed as a probability of infestation for every treatment at each moment.

On day 0, the data analysis of the treated groups did not show differences in the burden of *R. microplus* when compared to the control group, with a high probability of the presence of EFT from 0.80 to 1.0 between IVM, A, B, and control groups ($p > 0.05$). One of the strengths of this study was the fact that the control group always showed threshold coefficients of “medium” and “high” > 0.70 . During the whole study, no animals in the control group were ranked with the null presence of ticks, evidencing a continuous exposition of cattle to these parasites. The effect of time on the presence of EFT in the control group was not significant during the entire study (day 0–49) (OR 0.97, CI95%: 0.93–1.01, $p = 0.148$).

Early response

Early response from the data analysis for the IVM group shows the effect on the *R. microplus* burden when compared to the control group. On day 14 post-administration, the *chl*m displayed a favorable treatment response in the IVM group. The odds of the presence of EFT on day 14 was 0.013 times compared to the control group of animals, holding constant all other variables (OR 0.013, CI95%: 0.001–0.014, $p < 0.01$). The probability that the IVM group presents *medium* or *high* EFT versus *low* EFT is 0.20 (CI95%: 0.05–0.53)

pligis, with no probability to *null* (no EFT presence in animals).

For the combined formulations of IVM and FLU, similar results were obtained. On day 14 post-administration, the odds of EFT presence was 0.01 (OR 0.01, CI95%: 0.00–0.07, $p < 0.01$) and 0.01 (OR 0.01, CI95%: 0.00–0.148, $p < 0.01$) (A and B, respectively) times compared to the control group of animals, holding constant all other variables. The probability that the A and B group presents *medium* or *high* EFT versus *low* ticks was 0.10 (CI95%: 0.02–0.39) and 0.20 (CI95%: 0.05–0.54) pligis, respectively. This reflects the early response of the IVM plus FLU on both novel formulations combined, with no distinctive effect or favorable response to treatment between any of the formulations applied.

Late response

Data on response to treatment show differences when compared to the results for the early response. On day 27 post-administration, the probability that the IVM group continues to present *medium* or *high* EFT versus *low* EFT is 0.17 (CI95%: 0.04–0.64) pligis. An OR of 0.17 (CI95%: 0.04–0.50) for the *null* presence of EFT revealed a continuous challenge from the tick parasites. The odds of the presence of ticks on day 27 was not statistically different when compared to the control group, holding constant all other variables (OR 0.30, CI95%: 0.04–1.86, $p = 0.196$).

A and B groups did not differ on the results obtained for the late response data. The odds for EFT presence on day 27 were 0.02 times for A (OR 0.02, CI95%: 0.00–0.17, $p < 0.01$) and 0.06 times for B (OR 0.06, CI95%:

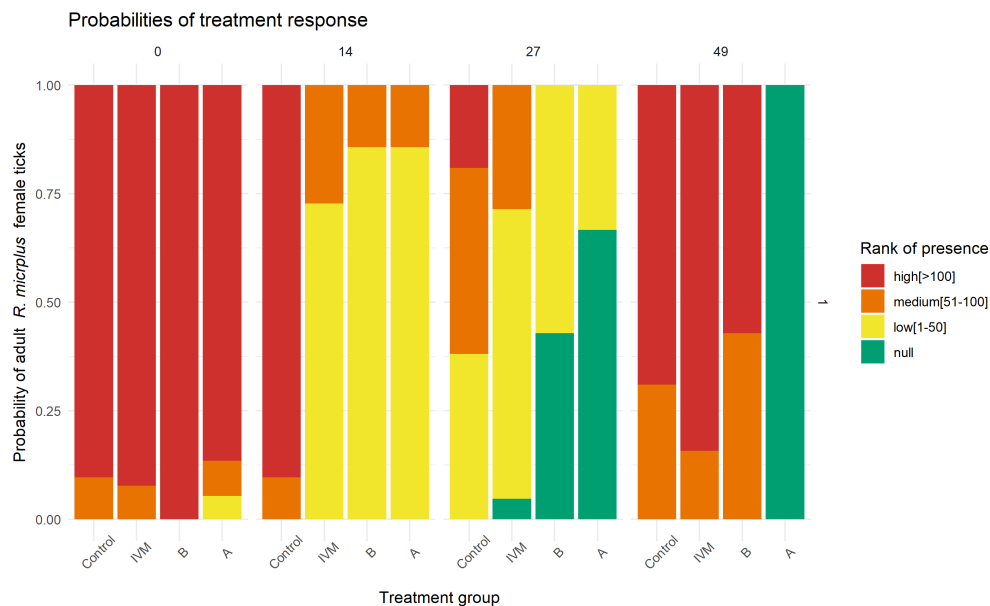


Fig. 1. The presence of adult female ticks on cattle under field conditions. IVM: group treated with IVM (0.2 mg/kg, 1%, subcutaneous); (A and B) two novel formulations of IVM combined with FLU (IVM 1% [0.2 mg/kg] + FLU 12.5% [2.5 mg/kg], subcutaneous); control group acted as tracer cattle (untreated). Days after formulations administration: 0, 14, 27, and 49.

0.00–0.46, $p < 0.01$) when compared to the control group animals, holding constant all other variables. The probability of null the presence of EFT was 0.74 (CI95% 0.42–0.92) and 0.50 (0.22–0.78) for groups A and B for the same time period when compared to the control group, respectively.

Delayed response

IVM group on day 49 post-administration showed similar behavior as the control group (OR 2.09, CI95%: 0.32–13.3, $p = 0.43$), with a probability of 0.95 (CI95% 0.92–1.02) animals with high parasite burden (more than 100 EFT), revealing a lack of protection in the IVM group after 49 days of administration.

Nevertheless, combined formulations showed differences in the delayed control of adult female ticks. For group A, all animals were free of EFT (OR 0.01, CI95%: 0.00–0.13, $p < 0.01$), while animals in group B showed the presence of EFT (OR 1.04, CI95%: 0.18–5.80, $p = 0.96$), compared to the control group animals, holding constant all other variables. Both combined formulations of IVM and FLU achieved different levels of control over tick population.

Discussion

For each time frame, we established treatment success (favorable treatment response) according to the probability of diminishing the level of infestation between the treated group and the control group. With ranked data and probabilities, we approached an epidemiological understanding: tick infestation under field conditions is a matter of probability of contact between the larvae and the host.

Early response

The probability for the early response of IVM reflects what has been proven by various authors on the rapid efficacy of IVM on the *R. microplus* population. Davey *et al.* (2005) reported an 83.2% reduction in adult female *R. microplus* after a single dose administration of IVM 1% on cattle after 12 days of administration. Cruz *et al.* (2015) tested different formulations of IVM administered by different routes, and under field conditions in Brazil. For subcutaneous administration, the maximum efficacy was observed on day 14 post-treatment (89.8%) for a 0.2 mg/kg dose of IVM.

The fact that some parasites remained on the animals might be due to the life cycle of *R. microplus* and the relationship between IVM plasma concentration and the life cycle (and hence the daily blood intake of the ticks), as exposed by Davey *et al.* (2005). A favorable treatment response with the null presence of EFT was not achieved on any of the animals included in the study after 14 days post-administration, compatible with an active parasite population as it was expected when working on field conditions and natural infestation.

Late response

Our results obtained for IVM on late response are consistent with the ones reported by Cruz *et al.* (2015), where they found that after the administration of an

IVM 1% formulation (0.2 mg/kg), the efficacy dropped from 90% (14 days post-administration) to a range of 32%–75% on day 28 post-administration. The high variability reported by the authors mentioned is due to the different strains of tick populations that can be found when working under field conditions.

When comparing these results to the ones obtained after applying IVM under different formulations, Cruz *et al.* (2015) reported an efficacy higher than 90% between days 7 and 49 post-treatment when working with an IVM 3.15% (0.63 mg/kg) long-acting formulation. The late response observed with long-acting formulations could be explained by the distinctive plasma profile of IVM obtained with these depot formulations. Lifschitz *et al.* (2007) demonstrated a higher persistence for IVM 3.15% formulations compared to IVM 1%, which could have significant effects on parasite control and dosage needed for control/eradication. Davey *et al.* (2010) proposed a cut-off point (8 ng/ml) for IVM plasma concentration administered in “long-acting” or “reservoir” formulations, above which there is efficacy against *R. microplus*.

Efficacy trials for IVM 3.15% after subcutaneous administration provide results that support the premise raised by Lifschitz *et al.* (2007) on the persistence of action based on the plasma profile. Nava *et al.* (2019) reported efficacy profiles against infestations with *R. microplus* after the administration of IVM 3.15%; from day 7 post-treatment until day 21, they observed efficacy percentages close to 100%. These results respond to a longer exposure time of the ticks to concentrations of IVM that are lethal for the parasite, affecting different evolutionary stages that appear with the advance of the parasitic biological cycle.

For combined formulations, the results show that both novel formulations of IVM combined with FLU for subcutaneous administration behave the same way for the 27 days of administration under field conditions. These field efficacy results are consistent with the fact that both formulations behaved as bioequivalent when it comes to IVM (Robaina *et al.*, 2021) and no major differences should be expected for both early and late response treatment success.

Delayed response

The response for the IVM group observed 49 days post-administration of a single dose of IVM (0.2 mg/kg) is consistent with the results reported by Davey *et al.* (2010) and Pereira (2009) for persistence of IVM efficacy on *R. microplus*, where treatment with IVM should be applied on a 30-day interval to achieve a successful control of ticks.

Group A showed a better performance when compared to group B, as shown by the lower OR on EFT presence after 49 days of administration. Group A achieved 100% efficacy despite the fact of an active population of *R. microplus* (showed by the result in the control group). This could be related to the long-term control effect of FLU included in the combination. FLU is responsible

of inhibiting chitin synthesis on immature ticks, preventing them to achieve adult stages. Differences found for both subcutaneous combinations of IVM and FLU could be related to differences between formulations (drug–drug interaction) and the impact that this could bring to the pharmacokinetic profile, as stated for different veterinary formulations studied by Toutain *et al.* (1997).

Insect growth regulators, such as FLU, could be responsible for the improvement of favorable treatment response achieved at day 49 by the combination of IVM and FLU given the delayed effect that this type of compounds have on insects' life cycle (Holdsworth *et al.*, 2006), when compared to a single subcutaneous administration of IVM (0.2 mg/kg). Gomes *et al.* (2015) tested different FLU presentations for the control of *R. microplus*; they tested a subcutaneous injection of FLU combined with IVM (1.6 mg/kg FLU + 0.63 mg/kg IVM) which achieved a lesser degree of protection compared to a pour-on formulation of FLU (2.5 mg/kg) or even versus a subcutaneous injection of IVM (0.63 mg/kg). Gomes *et al.* (2015) report an 82% reduction in adult ticks on day 21 post-administration of a combined formulation of IVM and FLU. When compared to the results obtained with the subcutaneous administration of IVM (0.63 mg/kg) that reached a peak of 86% efficacy on day 21 post-administration and the FLU group (pour-on administration, 2.5 mg/kg) which showed more than 90% efficacy between days 14 and 49 post-administration.

The lower number of ticks on days 27 and 49 for the control group could be a result of environmental effects (rain and heat), but mostly because the probability of picking up larvae from the pasture was lower than the reason being that all animals were kept in the same pasture. As the treatments were showing efficacy, the number of adult ticks was dropping. Efficacy field studies should be carried out to shed knowledge on the strategic use of combined formulations and to compare the efficacy of IVM and FLU under different formulations. Further studies are needed on the pharmacokinetic profile of combined formulations to better understand the interchangeability in pharmaceutical alternatives of combined IVM and FLU.

Conclusion

The combined formulations of IVM and FLU showed differences in efficacy and persistence under field conditions of its component drugs, which made it more effective than treatment with a single drug in controlling tick population in field conditions. The question is whether the use of combined formulations is the correct way or if the focus should be placed on improving the strategic use of these drugs. Complete control or eradication of parasite ticks could be achieved following a specific strategy and adjusting the time between doses.

Acknowledgment

This study was funded by ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) under a project from “Fondo María Viñas Modalidad I”.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' contributions

GS conceived, designed, and supervised the project. DR and GS executed the experiment and analyzed the data. All the authors interpreted the data, wrote, and critically revised the manuscript for intellectual content and approved the final version.

References

- Ahmed, N.A. 2016. Review of economically important cattle tick and its control in Ethiopia. *Adv. Life Sci. Technol.* 42, 51–64.
- Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., López, A. and Donatti, N. 1984. Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 20, 4–10.
- Cruz, B.C., Lopes, W.D., Maciel, W.G., Felippelli, G., Fávero, F.C., Teixeira, W.F., Carvalho, R.S., Ruivo, M.A., Colli, M.H., Sakamoto, C.A., da Costa, A.J. and De Oliveira, G.P. 2015. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. *Vet. Parasitol.* 207(3–4), 309–317.
- Cuore, U., Acosta, W., Bermúdez, F., Da Silva, O., García, I., Pérez Rama, R., Luengo, L., Trelles, A. and 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., Altuna, M., Cicero, L., Fernández, F., Luengo, L., Mendoza, R., Nari, A., Pérez Rama, R., Solari, M.A. and Trelles, A. 2012. Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48, 5–13.
- Cuore, U., Solari, M.A. and Trelles, A. 2017. Current status of resistance and first diagnostic of multiple resistance *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick simultaneously resistant to five drugs in Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 53(205), 13–19.
- Cuore, U., Solari, M.A., Piaggio, J., Chelle, B., Di Rienzo, D., Machado, N., Politi, P., Trelles, A. and Rampoldi, O. 2016. Comportamiento biológico y farmacocinético de dos formulaciones comerciales de ivermectina 3,15% en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)* 52(201), 13–22.
- Cuore, U., Trelles, A., Sanchis, J., Gayo, V. and Solari, M.A. 2007. Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria (Montevideo)* 42, 35–41.

- Davey, R.B., Miller, J.A., George, J.E. and Miller, R.J. 2005. Therapeutic and persistent efficacy of a single injection treatment of ivermectin and moxidectin against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on infested cattle. *Exp. App. Acarol.* 35(1–2), 117–129.
- Davey, R.B., Pound, J.M., Miller, J.A. and Klavons, J.A. 2010. Therapeutic and persistent efficacy of a long-acting (LA) formulation of ivermectin against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and sera concentration through time in treated cattle. *Vet. Parasitol.* 169(1–2), 149–156.
- Eckstein, C., Lopes, L., Romero Nicolino, R., Oliveira, C.S. and Haddad, J. 2015. Economic impacts of parasitic diseases in cattle. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 10(51), 1; doi:10.1079/PAVSNNR201510051
- Fiel, C. and Nari, A. 2013. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Montevideo, Uruguay: Hemisferio Sur.
- George, J., Pound, J. and Davey, R. 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129(S1), S353–S366.
- Gomes, L.V., Lopes, W.D., Cruz, B.C., Teixeira, W.F., Felippelli, G., Maciel, W.G., Bichuette, M.A., Ruivo, M.A., Alcantara Colli, M.H., Carvalho, R.S., Martinez, A.C., Soares, V.E. and da Costa, A.J. 2015. Acaricidal effects of fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluazuron (1.6 mg/kg)+ ivermectin (0.63 mg/kg), administered at different routes, against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitizing cattle. *Exp. Parasitol.* 153, 22–28.
- Holdsworth, P.A., Kemp, D., Green, P., Peter, R.J., De Bruin, C., Jonsson, N.N., Letonja, T., Rehbein, S., Vercruysse, J. and World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 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. *Vet. Parasitol.* 136(1), 29–43.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A. and Lanusse, C. 2007. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet. Parasitol.* 147(3–4), 303–310.
- Molento, M. 2020. Avaliação seletiva de bovinos para o controle do carrapato. Brasília, Brasil.: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available via <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/CARRAPATOS2.pdf> (Accessed 20 November 2020).
- Molento, M.B., Fortes, F.S., Pondelek, D.A., Borges, F.D., Chagas, A.C., Torres-Acosta, J.F. and Geldhof, P. 2011. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. *Vet. Parasitol.* 180(1–2), 126–132.
- Nava, S., Toffaletti, J.R., Morel, N., Guglielmone, A.A. and Mangold, A.J. 2019. Efficacy of winter–spring strategic control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations on cattle in an area with ecological conditions highly favourable for the tick in northeast Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 33(2), 312–316.
- Nolan, J. 1990. Acaricide resistance in single and multi-host tick and strategies for control. *Parassitologia* 32, 145–153.
- Pereira, J.R. 2009. The efficiency of avermectins (abamectin, doramectin and ivermectin) in the control of *Boophilus microplus*, in artificially infested bovines kept in field conditions. *Vet. Parasitol.* 162(1–2), 116–119.
- Prichard, R. 1994. Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 54, 259–268.
- R Studio Core Team. 2020. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available via <https://www.R-project.org/>
- Robaina, D., Alvariza, S. and Suárez, G. 2021. Bioequivalence of two novel formulations of ivermectin 1% combined with fluazuron 12.5% for subcutaneous administration in cattle. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 9(1), 88–97.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Jonsson, N.N. and Bhushan, C. 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol. Res.* 117, 3–29.
- Stone, B.F. 1972. The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Aust. Vet. J.* 48, 345–350.
- Sutherst, R.W., Norton, G.A., Barlow, N.D., Conway, G.R., Birley, M. and Comins, H. N. 1979. An analysis of management strategies for cattle tick (*Boophilus microplus*) control in Australia. *J. Appl. Ecol.* 16(2), 359.
- Toutain, P.L., Upson, D.W., Terhune, T.N. and McKenzie, M.E. 1997. Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in cattle. *Vet. Parasitol.* 72(1), 3–8.
- Waller, P.J. 2006. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Anim. Feed Sci. Tech.* 126, 277–289.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G. and Sangster, N.C. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 20(10), 469–476.

Consideraciones finales y conclusiones

El abanico de opciones terapéuticas presentes en el mercado veterinario nacional para el tratamiento parasitario de infestaciones con garrapatas del género *R. microplus* permite visualizar dos situaciones de tipo operacional: 1) el control farmacológico se presenta como la principal y más factible herramienta disponible para el control las parasitosis causadas por garrapatas en el bovino y 2) tal variedad farmacotécnica se vería beneficiada de ser evaluada mediante estudios de bioequivalencia y equivalencia terapéutica para asegurar una adecuada intercambiabilidad entre formulaciones similares.

Los ensayos de bioequivalencia tuvieron como objetivo demostrar la equivalencia biofarmacéutica entre formulaciones con similares composiciones, mediante la determinación de los principales parámetros cinéticos, buscando responder a la interrogante sobre intercambiabilidad terapéutica. Las formulaciones conocidas como “referencia” son aquellas que surgen de la inversión en innovación farmacotécnica y que cuentan con la patente para su producción y comercialización. Vencido el plazo de dicha patente, surgen los productos “similares” formulados por la competencia. Estas últimas pueden ser catalogadas tanto como “copias” o como “genérico” dependiendo de si logran demostrar bioequivalencia cinética con respecto al producto “referencia”. El mercado nacional uruguayo carece de marco legal que exija ensayos de bioequivalencia para las formulaciones medicamentosas veterinarias, por lo que solo se encuentran formulaciones de tipo “copia”, que no cuentan con ensayos de bioequivalencia. Sin embargo, las preparaciones medicamentosas que se registran en el país para uso en medicina veterinaria deben cumplir con la equivalencia terapéutica. Se entiende por equivalencia terapéutica al logro de que la respuesta a los tratamientos alcance una satisfactoria similitud entre dos formulaciones, con la misma dosis de principio activo y administrados por la misma vía. Tanto la bioequivalencia como la equivalencia terapéutica deberían ser estudiadas en conjunto para establecer la intercambiabilidad entre formulaciones.

El presente trabajo se basó en la premisa de determinar la equivalencia entre dos formulaciones novedosas de ivermectina combinada con fluazuron para administración parenteral subcutánea en bovinos, con hincapié en uno de sus compuestos: la ivermectina.

En el Capítulo I se determinó el perfil farmacocinético para ivermectina en ambas formulaciones combinadas con fluazuron. El comportamiento farmacocinético de ivermectina demostró ser bioequivalente lo que, en un principio, permitiría su intercambiabilidad con resultados similares a nivel terapéutico. El estudio de los parámetros farmacocinéticos primarios (área bajo la curva, velocidad de absorción) permitió la determinación de bioequivalencia, mientras que la construcción y validación del modelo farmacocinético fue la clave para evidenciar alguna diferencia en la disposición entre las formulaciones. Si bien ivermectina demostró ser bioequivalente (cumplió con los requisitos de Intervalo de confianza del 90%), existieron diferencias en la velocidad de ingreso de la droga al sistema, atribuible posiblemente a las diferencias farmacotécnicas entre las formulaciones combinadas con fluazuron.

Es esperable que al administrar formulaciones garrapaticidas bioequivalentes, el resultado terapéutico sea similar. Esto se debe a la premisa de la estrecha relación que existe entre los niveles plasmáticos de fármacos garrapaticidas y su eficacia para el control de dicho parásito. Si dos formulaciones, administradas por la misma vía, presentan similares perfiles cinéticos para sus compuestos garrapaticidas, los resultados terapéuticos frente a poblaciones parásitas se esperan sean similares (equivalencia terapéutica).

Ivermectina demostró ser bioequivalente entre ambas formulaciones combinadas con fluazuron, a pesar de las diferencias en su velocidad de ingreso y T_{max}. Frente al desconocimiento en los perfiles farmacocinéticos del fluazuron entre formulaciones, el siguiente paso fue la demostración de equivalencia terapéutica a campo.

El Capítulo II se basó en la determinación de la mencionada equivalencia terapéutica a campo para ivermectina en combinación con fluazuron. La determinación de la equivalencia terapéutica es de igual relevancia que la bioequivalencia farmacocinética, siendo que los productos garrapaticidas deberían responder de forma similar a la presión biológica de las poblaciones de garrapatas junto con las expectativas de los productores y veterinarios que esperan obtener resultados claros una vez aplicado el tratamiento. El ensayo a campo llevado a cabo en condiciones de campo permitió demostrar equivalencia terapéutica para IVM, con respuestas terapéuticas favorables para ambas formulaciones cuando fueron comparadas con el perfil de eficacia logrado por IVM en su formulación de referencia mundial (Ivomec®,

Boehringer Ingelheim, México). Una respuesta terapéutica positiva y similar (control de poblaciones de garrapatas) se demostró a los 14 días post-administración para ambas formulaciones combinadas con fluazuron; los resultados obtenidos fueron similares al efecto garrapaticida aportado por la formulación de referencia para IVM (Ivomec®, Boehringer Ingelheim, México) lo que deja en claro que la combinación con FLU no afectaría la respuesta esperada de IVM en su combinación. El control obtenido por la formulación considerada de referencia para el estudio (IVM 1%) disminuyó a medida que transcurrieron los días, siendo nulo hacia el día 27 post-administración, mientras que las combinaciones con FLU presentaron un efecto inhibitor sostenido sobre la presencia de garrapatas luego de 27 días de administradas. Este efecto se evidenció tras 49 días de la administración, resultado que atribuimos a la presencia de FLU y a sus efectos sobre el desarrollo del ciclo parasitario en los animales.

Si bien se demostró bioequivalencia para IVM entre las formulaciones combinadas con FLU incluidas en el ensayo, no se alcanzó a demostrar equivalencia terapéutica plena a campo, siendo que las formulaciones combinadas con FLU evidenciaron de forma parcial perfiles temporales de control en el ciclo parasitario en los animales estudiados.

La presente tesis permite concluir que los perfiles farmacocinéticos de ivermectina en las formulaciones combinadas con fluazuron estudiadas se consideran bioequivalentes y con una similar respuesta garrapaticida temprana a la administración única de ivermectina a campo en infestaciones naturales de *R. microplus*. No obstante, la potencial complementariedad del fluazuron en la combinación con ivermectina contribuye para establecer diferencias en el control a largo plazo en poblaciones de *R. microplus*. Los resultados alcanzados en la presente tesis, demuestran la importancia de la simultaneidad en la ejecución de estudios cinéticos y dinámicos en la determinación de la bioequivalencia y equivalencia terapéutica de formulaciones garrapaticidas combinadas de ivermectina y fluazuron.

Referencias bibliográficas

- Apanaskevich, D.A. y Oliver, J.H. 2014. Life cycle and natural history of ticks. En: *Biology of Ticks: Volume 1* (Sonenshine, D.E. y Roe, R.M.). Oxford University Press, Reino Unido.
- Arena, J.P., Liu, K.K., Paress, P.S., Frazier, E.G., Cully D.F., Mrozik, H., Schaeffer J.M. 1995. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: Correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J Parasitol*, 81:286–294.
- Ávila, D. 1998. Análisis Cuantitativo de los Costos a Nivel País y del Productor por la Presencia de la Garrapata en el Uruguay. Informe IAEA-DILAVE-MGAP
- Benavides, E. y Romero, N. 2001. Consideraciones para el control integral de parásitos externos del ganado. *Revista Carta Fedegán*. 70:64-86
- Benet, L. 1984. Pharmacokinetics: Basic Principles and Its Use as a Tool in Drug Metabolism. En: *Drug Metabolism and Drug Toxicity* (Mitchell, J.R. y Horning, M.G). Raven Press, New York.
- Betancur, O., y Giraldo-Ríos, C. 2019. Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. En: *Ticks and Tick-Borne Pathogens* (Abubakar, M. y Perera, P. K.). IntechOpen.
- Camicas, J.L., Hervy, J.P., Adam, F. y Morel, P.C. 1998. The Ticks of the World, nomenclature, described stages, hosts and distribution (Acarida, Ixodida). Orstom Editions, Paris.
- Campbell, W.C. and Benz, G.W. (1984) Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 7, 1–16.
- Caproni, L. Jr., Umehara, O., Moro, E. y Goncalves, L.C.B. 1998. Field efficacy of doramectin and ivermectin against natural infestations of the cattle tick *Boophilus microplus*. Brazil. *J. Vet. Parasitol.* 7: 151–155
- Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., López, A., Donatti, N. 1984. Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo); 20:4-10.
- Cassamagnaghi, A. 1923. El perro como vector del *Boophilus microplus*. *Rev. Asoc. Rural Uruguay*, 52: 59-61
- Castro-Janer, E., Rifran, R., Gonzalez, P., Niell, C., Piaggio, J., Gill, A., Schu-maker, T.T. 2011. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 178, 148–155.
- Cully, D.F., Wilkinson, H., Vassilatis, D.K., Eter, A., Arena J.P. 1996. Molecular biology and electrophysiology of glutamate-gated chloride channels of invertebrates. *Parasitology*, 113(suppl):S191–S200.
- Cuore, U. 2006. Resistencia a los acaricidas, manejo y perspectivas. *Jornadas Uruguayas de Buiatría*. 34, Paysandú, Uruguay, pp. 30-35.
- Cuore, U., Trelles, A., Sanchís, J., Gayo, V., y Solari, M.A. 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., Fernández, F., Luengo, L., Mendoza, R., Nari, A., Pérez Rama, R., Solari, M. y Trelles, A. 2012. Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente 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. y 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.

Davey, R.B., Miller, J.A., George, J.E., y Miller, R. J. 2005. Therapeutic and persistent efficacy of a single injection treatment of ivermectin and moxidectin against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on infested cattle. *Experimental and Applied Acarology*, 35(1-2), 117-129.

Davey, R.B., Pound, J.M., Miller, J.A., Klavons, J.A., 2010. Therapeutic and persistent efficacy of a long-acting (LA) formulation of ivermectin against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and sera concentration through time in treated cattle. *Vet. Parasitol.* 169, 149–156

Domínguez, D., Torres, F. y Rosario-Cruz, R. 2016. Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias.* 5(9)

Egerton, J.R., Eary, C.H. and Suhayda, D. 1981. The anthelmintic efficacy of ivermectin in experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* 8, 59–70.

European Medicine Agency (EMA). 2018. Guideline on the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. Available on: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-conduct-bioequivalence-studies-veterinary-medicinal-products-revision-3_en.pdf. Consulted on: october, 2020.

FDA/CVM. 2006. Guidance for Industry: Bioequivalence Guidance guidance #35. FDA/CVM. United States (US), Food and Drug Administration / Center for Veterinary Medicine (FDA/CVM).

Fiel C., Nari A. 2013. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. Montevideo, Hemisferio Sur, 751 p.

Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D., Petney, T., Estrada-Peña, A., Horak, I., Shao, R.F., & Barker, S. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. *Experimental and Applied Acarology*. 28. 27-54.

Holdsworth, P.A., Kemp, D., Green, P., Peter, R.J., De Bruin, C., Jonsson, N.N., Letonja, T., Rehbein, S. y Vercruysse, 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. *Vet. Parasitol.*, 136(1), 29–43.

Holford, N. 2006. Dose Response: Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Approach. En: *Dose Finding in Drug Development* (Ting, N.). Springer, New York.

Horak, I.G., Camicas, J.L. y Keirans, J.E. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol.* 28(1-4):27-54.

- Jackson, H.C. 1989. Ivermectin as a systemic insecticide. *Parasitology Today*, 5(5), 146–156.
- Jongejan, F. y Uilenberg, G. 2004. The Global Importance of Ticks. *Parasitology*. 129 Suppl. S3-14. 10.1017/S0031182004005967.
- Jonsson, N.N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.* ;137(1–2):1–10.
- Klafke, G., Webster, A., Agnol, B.D., Pradel, E., Silva, J., Canal, L.H., Becker, M., Ósorio, M., Manson, M., Barreto, R., Scheffer, R., Souza, U., Corassini, V., dos Santos, J., Reck, J. y Martins, J. 2017. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(1), 73-80.
- Kocan, K.M., Fuente, J., Guglielmone, A.A., Melendez, R.D. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*;16: 698–712.
- Krantz, G.W. y Walter, D.E. 2009. *A Manual of Acarology*. 3rd Edition. Texas Tech University Press, Lubbock: 807 pp.
- Laffont, C., Bousquet-Mélou, A., Bralet, D., Alvinerie, M., Fink-Gremmels, J., Toutain, P. 2003. A pharmacokinetic model to document the actual disposition of topical ivermectin in cattle. *Vet Res*, 34, 445-460.
- Lahille, F. 1905. Contribution à l'étude de Ixodidés de la République Argentine. *An. Minist. Agric.*, 2:7-166
- Laing, R., Gillan, V., & Devaney, E. 2017. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends in Parasitology*, 33(6), 463-472. doi:10.1016/j.pt.2017.02.004
- Lanusse, C. 2009 Contribución fármaco-parasitológica integrada a la comprensión del fenómeno de resistencia antihelmíntica. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV). *Anales de la ANAV*.
- Lanusse, C., Canton, C., Virkel, G., Alvarez, L., Costa-Junior, L., y Lifschitz, A. 2018. *Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants. Trends in Parasitology*, 34(8), 664–682.
- Lifschitz, A., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Lorda, J.J., y Lanusse, C. 2004. Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. *Veterinary Parasitology*, 119(2-3), 247-257.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., y Lanusse, C. 2007. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: Absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet Parasitol*, 147(3-4), 303-310.
- Lifschitz, A., Nava, S., Mangold, A.J., Imperiale, F., Ballent, M., Canevari, J., Lanusse, C., 2016. Eprinomectin accumulation in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: pharmacokinetic and efficacy assessment. *Vet. Parasitol.* 215, 11–16
- Lo, P.A., Fink, D.W., Williams, J.B., Blodinger, J. 1985. Pharmacokinetic studies of ivermectin: Effects of formulation. *Veterinary Research Communications*, 9(1), 251-268.

Martin, R.J., Robertson, A.P. y Wolstenholme A.J. 2002. Mode of Action of Macrocyclic Lactones. En: Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy (Vercruysse, J. y Rew, R.S.). CABI Publishing. Oxon, United Kingdom

Maske, D.K., Sardey, M.R., Bhilegaonkar, N.G. 1992. Treatment of tick infestations in cattle with ivermectin. Indian Vet J 69:57–58

MGAP. 2020. Listado de garrapaticidas. URL: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/listado-garrapaticidas-0>. Último acceso: 14 de noviembre de 2020.

Miller, J.A., Davey, R.B., Oehler, D.D., Pound, J.M., George, J.E., Ahrens, E.H. 1999. Control of *Boophilus annulatus* (Say) (Acari: Ixodidae) on cattle using injectable microspheres containing ivermectin. J. Econ. Entomol. 92, 1142–1146.

Miraballes, C. y Riet-Correa, F. 2018. A review of the history of research and control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay Experimental and Applied Acarology (E), 754, 383 - 398.

Molento, M. 2020. Avaliação seletiva de bovinos para o controle do carrapato. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, Brasil.

Nava, S., Toffaletti, J.R., Morel, N., Guglielmone, A.A. y Mangold, A.J. 2019. Efficacy of winter–spring strategic control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations on cattle in an area with ecological conditions highly favourable for the tick in northeast Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, 33(2), 312-316.

Nicholson, W.L., Sonenshine, D.E., Noden, B.H., y Brown, R.N. 2019. Ticks (Ixodida). *Medical and Veterinary Entomology*, 603-672.

Nolan, J., Schnitzerling, H.J., Bird, P. 1985. The use of ivermectin to cleanse tick infested cattle. *Australian Veterinary Journal*. 62, 386–388

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

Nuñez, J.L., Muñoz-Cobeñas, M.E. y Molledo, H.L. 1985. *Boophilus microplus*, the Common Cattle Tick. Berlin: Springer-Verlag.

Nuñez, J., Muñoz, M., Molledo, H. 1987. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno, Buenos Aires, Hemisferio Sur, 184p.

Peñalver, E., Arillo, A., Delclòs, X., Peris, D., Grimaldi, D.A., Anderson, S.R., Nascimbene, C. & Pérez-de la Fuente, R. 2017. Ticks parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. *Nat Commun* 8, 1924.

Pereira, J.R., 2009. The efficiency of avermectins (abamectin, doramectin and ivermectin) in the control of *Boophilus microplus*, in artificially infested bovines kept in field conditions. *Vet. Parasitol.* 162, 116–119.

Playford, M. 2005. Review of research needs for cattle tick control - Phases I and II (pp. 1-117, Rep.). Sydney, NSW: Meat & Livestock Australia.

Pound, J.M., Miller, J.A., George, J.E., Oehler, D.D., Harmel, D.E. 1996. Systemic treatment of white-tailed deer with ivermectin-medicated bait to control free-living populations of lone star ticks (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 33, 385–394

Prichard R. Anthelmintic resistance. Vet Parasitol 1994; 54, 259-268.

Rodrigues, D. y Leite, R. 2013. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia 65(5):1570–2.

Rodríguez, R., Ojeda, M., Pérez, L. y Rosado, J. 2011. Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. En: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos (Quiroz, H., Figueroa, J., Ibarra, F. y López, M.). pp. 477-504. UNAM: México.

Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F. y Fragoso, S.H. 2005. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal (Rodríguez-Vivas, R.I.). p. 571–92. McGraw-Hill, México.

Schaeffer, J. M., & Haines, H. W. 1989. Avermectin binding in *Caenorhabditis elegans*. A two-state model for the avermectin binding site. Biochemical pharmacology, 38(14), 2329–2338.

Shoop, W. y Soll, M. 2002. Ivermectin, Abamectin and Eprinomectin. En: Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy (Vercruysse, J. y Rew, R.S.). CABI Publishing. Oxon, United Kingdom.

Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S., Pavek, P. 2010. Expression and function of P-Glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. En: Multi-Drug Resistance in Cancer (Zhou J). Human Press. New York.

Stone BF. The genetics of resistance by ticks to acaricides. Austr Vet J 1972; 48: 345-350.

Sonenshine, D.E. y Roe, R. M. 2014a. Biology of ticks: Volume 1. Oxford University Press, Reino Unido.

Sonenshine, D.E., y Roe, R. M. 2014b. Biology of ticks: Volume 2. Oxford University Press, Reino Unido.

Steinijans, V.W. & Hauschke, D. 1993. International harmonization of regulatory bioequivalence requirements. Clinical Research and Regulatory Affairs, 10, 203-220.

Toutain, P., Campan, M., Galtier, P. y Alvinerie, M. 1988. Kinetic and insecticidal properties of ivermectin residues in milk of dairy cows. J Vet Pharmacol Ther. 11. 288-91.

Toutain, P., y Koritz, G.D. 1997. Veterinary drug bioequivalence determination. J Vet Pharmacol Ther, 20(2), 79-90.

Venzal, J., Castro, O., Cabrera, P.A., Souza, C.G. y Guglielmone, A.A. 2003. Las garrapatas de Uruguay: Especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. Veterinaria (Montevideo). 38. 17-28.

Vercruysse, J. y Rew R. 2002. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy* (1st ed., pp 125-140). CABI Publishing.

Vogelsang, E. 1928. Garrapatas (Ixodidae) del Uruguay. Bol. Inst. Clín. Quir. Buenos Aires, 4:668-670

Wilkinson, P.K., Pope, D.G., Baylis, F.P., 1985. Pharmacokinetics of ivermectin administered intravenously to cattle. J. Pharm. Sci. 74, 1105-1107.

Wolffhügel, K. 1916. Garrapatos (Ixodidae) del Uruguay. Rev. Med. Vet. Uruguay, 2: 106- 107.

Anexo 1: Determinación de parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos se estimaron directamente a partir de los datos experimentales mediante un análisis no compartimental por método de los trapecios según las siguientes ecuaciones:

$$AUC_{(0-T)} = \sum_0^T \left(\frac{C_{tn} + C_{(tn+1)}}{2} \right) \times (t_{(n+1)} - t_n)$$

Ec. 1

Siendo T el último tiempo de muestreo.

Para obtener el parámetro $AUC_{0-\infty}$ se le suma a AUC_{0-T} el término $CT / \lambda Z$ siendo CT la concentración obtenida en el último tiempo de muestreo y λZ la constante de velocidad de eliminación, calculada como la pendiente de la regresión lineal del logaritmo neperiano de la concentración versus tiempo ($\ln(C)$ vs. t)

$$AUC_{(0-\infty)} = \frac{AUC_{(0-T)}}{\lambda_Z}$$

Ec 2

Dos productos se consideran bioequivalentes cuando el cociente de medias geométricas poblacionales Test/Referencia para $AUC_{0-\infty}$ y C_{max} , está incluido en el intervalo 0.8 – 1.25 con una probabilidad del 90%.

$$0.8 \leq \frac{AUC_{(0-\infty)_{Test}}}{AUC_{(0-\infty)_{Ref}}} \leq 1.25$$

Ec.3

AUC_{0-∞} y C_{max} se distribuyen naturalmente de forma log-normal por lo que, tras una transformación logarítmica de los parámetros individuales, test estadísticos paramétricos como ANOVA pueden ser aplicados para la determinación del intervalo de confianza del 90%. Para T_{max}, este parámetro sólo puede tomar los valores determinados por el muestreo por lo que presenta una distribución no normal. Es necesario entonces la utilización de test estadísticos no paramétricos como el Test de Wilcoxon para la comparación de las medianas, las cuales no deberán presentar una diferencia mayor al 20%. Dos formulaciones se consideraron estadísticamente bioequivalentes o de similar biodisponibilidad relativa si el intervalo de confianza del 90% (IC90%) para el cociente de valores medios (con datos logarítmicamente transformados) de los parámetros AUC_{0-t} y C_{max} se ubica entre 0.80 y 1.25 (FDA/CVM, 2006).

Anexo 2: Producción científica y comunicación

Artículos publicados en revistas arbitradas

Robaina, D.; Alvariza, S.; Suárez, G. 2021. Bioequivalence of two novel formulations of ivermectin 1% combined with fluazuron 12.5% for subcutaneous administration in cattle. J Pharm Pharmacogn Res 9(1): 88–97

Manuscritos enviados a evaluación

Robaina, D.; Alvariza, S.; Suárez, G. Therapeutic Equivalence Of Ivermectin 1 % And Two Novel Formulations Combined Of Ivermectin 1% + Fluazuron 12.5 % For The Control Of *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* In Uruguay. Agrociencia. Enviado el 24 de noviembre del 2020.

Comunicaciones a congresos

Robaina, D., Suárez, G. 2017. Evaluación de las alternativas terapéuticas de Fluazuron en el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mediante estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en bovinos naturalmente infectados. Lugar: 10° Jornadas Técnicas Veterinarias, Montevideo, Uruguay. Tipo: Póster

Robaina, D., Alvariza, A., Suárez, G. 2018. Bioequivalence of ivermectin in combined formulations of ivermectin / fluazuron. Lugar: Congreso Iberoamericano de la Red de Farmacometría 2018. Tipo: Póster

Proyectos financiados vinculados al trabajo de tesis

FUNDACIBA (Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Básicas, Montevideo, Uruguay) – Donación número: 201712033056. Título del proyecto: “Caracterizar la terapéutica combinada de Ivermectina - Fluazurón en bovinos “

ANII - Proyecto de investigación Aplicada Fondo María Viñas Modalidad 1 - 2017. Título del proyecto: “Evaluación de las alternativas terapéuticas de Fluazuron en el control de *Rhipicephalus*

(Boophilus) microplus mediante estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en bovinos naturalmente infectados” (N° de proyecto: FMV_1_2017_1_136843).

Becas

Contrato como investigador. FUNDACIBA (Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Básicas, Montevideo, Uruguay) – Título del proyecto: “Caracterizar la terapéutica combinada de Ivermectina - Fluazurón en bovinos“- Donación número: 201712033056.

Beca otorgada por el Fondo María Viñas Modalidad I para la realización del proyecto: “Evaluación de las alternativas terapéuticas de Fluazuron en el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mediante estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en bovinos naturalmente infectados” (N° de proyecto: FMV_1_2017_1_136843). Responsable: Gonzalo Suárez (DCTV, PhD). Co- responsable: Silvana Alvariza (QF, PhD).