



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS
FARMACOCINÉTICOS DE IVERMECTINA ADMINISTRADA
VÍA ORAL Y SUBCUTÁNEA EN CANINOS”

Cheryl Michelle Telting Lyán

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas.

PROFESOR GUÍA : DRA. DANIELA IRAGÜEN CONTRERAS

FINANCIAMIENTO : LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA VETERINARIA FAVET

SANTIAGO, CHILE
2010



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS
 FARMACOCINÉTICOS DE IVERMECTINA ADMINISTRADA
 VÍA ORAL Y SUBCUTÁNEA EN CANINOS”

Cheryl Michelle Telting Lyán

Memoria para optar al Título
 Profesional de Médico Veterinario
 Departamento de Ciencias Clínicas.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DRA. DANIELA IRAGÜEN CONTRERAS
PROFESOR CONSEJERO: DRA. BETTY SAN MARTIN NUÑEZ
PROFESOR CONSEJERO: DRA. SONIA ANTICEVIC CÁCERES

SANTIAGO, CHILE
 2010

MEMORIA DE TÍTULO

“COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE IVERMECTINA ADMINISTRADA VÍA ORAL Y SUBCUTÁNEA EN CANINOS”.

Cheryl Telting Lyán*

**Unidad de Farmacología Veterinaria, Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.*

El objetivo de este estudio es describir y comparar el comportamiento farmacocinético de ivermectina (IVM) administrada por vía oral (p.o.) y subcutánea (s.c.) en perros. Previamente fue necesario adaptar y validar un método cromatográfico para detectar y cuantificar IVM en plasma canino, siguiendo las recomendaciones de la FDA. Se trabajó con ocho perros, los que fueron asignados a dos grupos experimentales de cuatro perros (Grupo A y Grupo B), de manera de obtener pesos promedios similares. A los individuos del Grupo A se les administró vía s.c. una dosis única de 200 µg/kg de peso corporal de IVM. A los individuos del Grupo B se les administró vía p.o. una dosis única de 600 µg/kg de peso corporal de IVM. Se recolectaron muestras de sangre entre 1 hora y 40 días después de la administración. Posteriormente el plasma fue analizado por cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de fluorescencia (HPLC-FLUOR). Los resultados señalaron que, la concentración máxima alcanzada ($C_{m\acute{a}x}$) y el tiempo en el que se alcanzó la máxima concentración ($T_{m\acute{a}x}$) fueron significativamente mayores y en menor tiempo ($p < 0,05$) en el Grupo B ($C_{m\acute{a}x}$: 276,04 ± 34,47 ng/ml y $T_{m\acute{a}x}$: 0,27 ± 0,16 días) (promedio ± DS) comparado con el Grupo A ($C_{m\acute{a}x}$: 58,90 ± 10,26 ng/ml y $T_{m\acute{a}x}$: 2,50 ± 0,58 días). El área bajo la curva final (ABC_{final}) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el Grupo B (ABC_{final} : 573,66 ± 154,60 ng/día/ml) comparado con el Grupo A (ABC_{final} : 332,10 ± 92,73 ng/día/ml); lo mismo ocurrió en el caso del área bajo la curva extrapolada al infinito (ABC_{∞}) donde se observa que, en el Grupo B, los resultados son significativamente mayores ($p < 0,05$) (ABC_{∞} : 580,77 ± 155,63 ng/día/ml) comparados con el Grupo A (ABC_{∞} : 345,24 ± 96,55 ng/día/ml). El Grupo A presentó un clearance (CL) significativamente más bajo ($p < 0,05$) (CL: 615,87 ± 175,64 ml/kg/día) que el Grupo B (CL: 1087,96 ± 276,64 ml/kg/día). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos para los siguientes parámetros: constante de eliminación (K_{el}), vida media de eliminación ($T_{1/2}$) y volumen de distribución (Vd).

Palabras clave: ivermectina, farmacocinética, HPLC-FLUOR.

This study describes and compares plasma disposition kinetics of ivermectin (IVM) following oral (p.o.) and subcutaneous (s.c.) administration in dogs. The analytical method used for detection and quantification of IVM in dog plasma was validated according to FDA regulations. Eight dogs were allocated in two groups of four animals (Group A and Group B) thus obtain similar mean weights. Dogs in Group A received subcutaneously a single dose of 200 µg/kg bodyweight of IVM. Dogs in Group B received orally a single dose of 600 µg/kg bodyweight of IVM. Blood samples were collected between 1 hour and 40 days after administration. Plasma was analyzed later by high performance liquid chromatography using fluorescence detection (HPLC-FLUOR). The results showed that Group B had a significantly higher ($p < 0,05$) maximum plasma concentration, with faster absorption ($C_{m\acute{a}x}$: 276,04 ± 34,47 ng/ml and $T_{m\acute{a}x}$: 0,27 ± 0,16 days) (mean ± SD) as compared with Group A ($C_{m\acute{a}x}$: 58,90 ± 10,26 ng/ml and $T_{m\acute{a}x}$: 2,50 ± 0,58 days). The area under the concentration versus time curve (final and extrapolated to infinity) was significantly larger ($p < 0,05$) in Group B (AUC_{final} : 573,66 ± 154,60 ng/day/ml; AUC_{∞} : 580,77 ± 155,63 ng/day/ml) as compared with Group A (AUC_{final} : 332,10 ± 92,73 ng/day/ml; AUC_{∞} : 345,24 ± 96,55 ng/day/ml). Group A had a significantly lower ($p < 0,05$) clearance (CL: 615,87 ± 175,64 ml/kg/day) than Group B (CL: 1087,96 ± 276,64 ml/kg/day). No significant differences ($p > 0,05$) were observed for the elimination constant (K_{el}), elimination half-life ($T_{1/2}$) and volume of distribution (Vd) for both groups.

Key words: ivermectin, pharmacokinetics, HPLC-FLUOR.

Introducción

En el año 1981 la introducción de las primeras avermectinas revolucionó el mercado farmacéutico veterinario en el control de las enfermedades parasitarias, principalmente por su elevada potencia farmacológica, al ser dosificados en el orden de $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo y por su amplio espectro de actividad sobre endo y ectoparásitos, recibiendo la denominación de fármacos *endectocidas* (Lifschitz *et al.*, 2002).

Dentro de éstos, uno de los más utilizados en especies productivas es la ivermectina (IVM); sin embargo, de un tiempo a esta parte su uso se ha extendido a pequeños animales, especialmente a los caninos, ya que es un fármaco que ha demostrado ser altamente eficaz en el tratamiento de infestaciones por distintos ectoparásitos (Gokbulut *et al.*, 2006) entre los que podemos mencionar *Sarcoptes scabiei* (Kaya *et al.*, 2010) y *Demodex canis* (Paterson *et al.*, 2009).

Existen indicaciones de uso de IVM en perros que están aprobadas por la "Food and Drug Administration" (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, principalmente para prevención de dirofilariasis, en dosis de $6 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía oral (p.o.) una vez al mes (Mueller, 2004, González *et al.*, 2009), otras aplicaciones estarían fuera de la aprobación oficial, lo que se denomina "off-label use" o uso *extraetiqueta*.

En Chile, la IVM está registrada para ser utilizada en bovinos, ovinos y camélidos sudamericanos vía subcutánea (s.c.) en dosis de $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso; en porcinos vía s.c. en dosis de $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso y en equinos vía p.o. en dosis de $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso (SAG, 2010). Esta situación conlleva a que el médico veterinario tenga que utilizar este fármaco bajo el concepto *extraetiqueta* en afecciones

dermatológicas como la demodicosis generalizada canina (DGC). El concepto *extraetiqueta* significa que los fármacos se utilizan en dosis, vías de administración o especies no señaladas en el registro de medicamentos. En consecuencia, la descripción farmacocinética de esta droga utilizada de forma *extraetiqueta* no está completamente definida.

La eficacia de la terapia convencional para la DGC, realizadas con baños de amitraz y aplicación de IVM vía s.c. en dosis de 200 a $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso administrada semanalmente, es, según Paterson (2009), limitada y variable puesto que el rango de eficacia para el amitraz varía entre un 0% y un 100% mientras que la eficacia del uso de IVM vía s.c. varía entre un 0% y un 54%. Por otro lado, Paradis, (1999), señaló que el uso tópico de amitraz no siempre es efectivo ni bien tolerado en perros con DGC.

Existen suficientes estudios clínicos con evidencia de la efectividad de la IVM administrada vía p.o. frente a la DGC. Así por ejemplo, Paradis, (1999), señala que existen varios protocolos de tratamiento con dosis de los 300 a $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso. Mueller, (2004), señala que, a dosis de $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía p.o., se obtienen buenos resultados clínicos frente a esta patología. Moreno, (2009), logra curas parasitológicas, entre las 11 y 36 semanas de instaurada la terapia, en el 100% de los pacientes tratados con $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía p.o. diariamente. Paterson *et al.*, (2009), describió que cuando se utiliza IVM en dosis de $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía p.o. cada 24 horas durante 4 meses en pacientes con DGC, se obtiene una reducción de un 98% en el conteo final de ácaros adultos, y un 97% en el conteo final de ácaros juveniles.

Uno de los productos que se utiliza

de manera *extraetiqueta* en caninos en nuestro país para el tratamiento de la DGC es IVM 1%, formulado para ser administrado vía s.c. a bovinos, ovinos y porcinos, el cual ha demostrado buenos resultados en el tratamiento de dicha enfermedad (Moreno, 2009).

Características farmacológicas de la ivermectina

Esta droga proviene de las lactonas macrocíclicas, que corresponden a un amplio grupo de antiparasitarios dentro del que se encuentran las avermectinas y las milbemicinas. Las avermectinas derivan de la fermentación del actinomiceto *Streptomyces avermitilis*. La abamectina (AVM B_{1a}) es un producto natural proveniente de la fermentación y la IVM es un derivado semisintético de la AVM B_{1a}, conteniendo un 80% de 22,23-dihidroavermectina B_{1a} y no más de un 20% de 22,23-dihidroavermectina B_{1b} (Figura 1) (Lifschitz *et al.*, 2002).

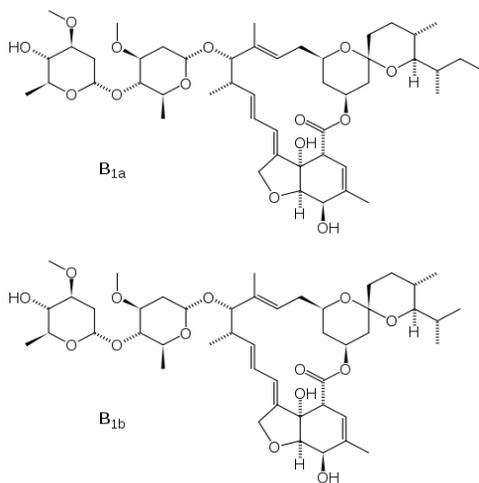


Figura 1. Estructura química de la ivermectina

Tiene una compleja estructura química similar a la de los antibióticos macrólidos pero carece de efecto antibacteriano; es una molécula de gran tamaño con un peso

molecular de 800 kDa (Lifschitz *et al.*, 2002). Es altamente efectiva frente a nemátodos y artrópodos ectoparásitos en diferentes hospederos, pero no es efectiva contra tremátodos ni céstodos (Gokbulut *et al.*, 2006).

El espectro de acción en caninos incluye nemátodos tales como: *Dirofilaria immitis*, *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma caninum*, *Uncinaria stenocephala* y *Trichuris vulpis*; y artrópodos tales como: *Sarcoptes scabiei* y *Otodectes cynotis* (González *et al.*, 2009).

Con respecto al mecanismo de acción se describe que actúa uniéndose selectivamente a los receptores de neurotransmisores específicos que funcionan en las sinapsis motoras periféricas de los parásitos. Su efecto endectocida causa la parálisis de nemátodos, artrópodos e insectos, suprimiendo la conducción de impulsos nerviosos en las sinapsis interneuronales de los nemátodos y las sinapsis neuromusculares en artrópodos e insectos bloqueando la transmisión nerviosa en canales iónicos asociados a glutamato (Glu) en invertebrados (Dourmishev *et al.*, 2005).

En humanos, el ácido gama-aminobutírico (GABA) y el Glu no afectan la función motora periférica. Así, la IVM paraliza selectivamente a invertebrados. Es bien tolerada en mamíferos ya que la ubicación de los canales iónicos asociados a Glu y los canales de Cl⁻ asociados a GABA está restringida al sistema nervioso central (SNC), siendo la IVM incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Dourmishev *et al.*, 2005).

De acuerdo al mecanismo de acción, el riesgo de utilizar la droga de manera *extraetiqueta* es que existen perros genéticamente susceptibles en los que la IVM

sí atraviesa la BHE provocando neurotoxicidad debido a la expresión defectuosa de la glicoproteína-P (P-gp) (Mealey, 2004).

La P-gp es la encargada de la eliminación de toxinas y xenobióticos desde las células y se encuentra ubicada en la porción apical de las células epiteliales del intestino, el túbulo contorneado proximal renal, la membrana del canalículo biliar en el hepatocito y las células endoteliales de los capilares cerebrales (BHE) (Mealey, 2004).

Algunos perros de raza Collie, Pincher y Old England Sheepdog o mestizos de estas razas, presentan una sensibilidad mayor a este fármaco. Ésta se manifiesta con signos neurológicos tales como hipersalivación, ataxia, ceguera, coma, compromiso respiratorio y muerte. Hoy en día se ha demostrado que los perros de raza Collie sensibles a la IVM presentan una mutación en el gen de multirresistencia a drogas "Multi Drug Resistance" (MDR1) determinando que la síntesis de la P-gp termine en forma prematura dando origen a una proteína afuncional (Edwards, 2003).

Esto explica el mayor paso de la droga al sistema nervioso central en perros con mutación en el gen MDR1, lo cual desencadena la cascada de signos neurológicos (Mealey, 2004).

De acuerdo a lo descrito por Edwards (2003), los perros homocigotos para la mutación (*mdr1/mdr1*) desarrollan el fenotipo sensible a la IVM, mientras que los homocigotos normales (*MDR1/MDR1*) o heterocigotos (*MDR1/mdr1*) no muestran signos de toxicidad.

Una dosis de 50-60 µg/kg de peso de IVM ha resultado ser segura en individuos de raza Collie que son reconocidamente susceptibles a la droga (Hopper *et al.*, 2002).

Puede ser administrada vía p.o., s.c., intramuscular (i.m.) o vía tópica dependiendo de la especie (Gokbulut *et al.*, 2006). Cuando se administra de acuerdo a las instrucciones del laboratorio fabricante (vía s.c.), el comportamiento farmacocinético se caracteriza por tener un proceso de absorción lento, una amplia distribución en el organismo, un metabolismo bajo y una excreción lenta. Los parámetros farmacocinéticos varían dependiendo de la vía de administración, formulación utilizada, especie animal, condición corporal, edad y estado fisiológico (González *et al.*, 2009).

Las propiedades farmacocinéticas son dosis-dependiente, con un incremento lineal en el área bajo la curva (ABC) a medida que la dosis aumenta. De acuerdo a lo señalado farmacocinéticamente, los valores más bajos de ABC se obtienen después de una aplicación tópica. La absorción de IVM vía parenteral es más lenta cuando es administrada por vía s.c. (Gokbulut *et al.*, 2006), pero conduce a que haya una mayor disponibilidad en plasma, una mayor duración de su actividad y una mayor eficacia. La menor magnitud de absorción vía p.o. puede estar influida por la P-gp debido a que ésta se encuentra presente también en el epitelio intestinal (González *et al.*, 2009). La mayor biodisponibilidad se puede obtener en la aplicación s.c., seguida por la vía p.o. (Gokbulut *et al.*, 2006).

Por otro lado, la baja hidrosolubilidad de esta molécula y su precipitación en tejidos subcutáneos favorecen la lenta absorción desde el sitio de inyección, lo que permite que el fármaco se encuentre presente en el flujo sanguíneo por tiempos prolongados (González *et al.*, 2009).

Debido a su naturaleza lipofílica, tiene un amplio volumen de distribución aparente

(V_{da}) en todas las especies. Tiende a acumularse en tejido graso, el que actúa como reservorio de la droga encontrándose los mayores niveles en hígado y grasa y los menores niveles en tejido cerebral (Lifschitz *et al.*, 2002).

Estudios en perros demuestran que se une a albúmina y lipoproteínas; esto se debería considerar en perros que están desnutridos o en los que padezcan alguna enfermedad que provoque hipoproteinemia, porque pudiera observarse en ellos una elevada fracción libre de la droga (González *et al.*, 2009).

Un bajo porcentaje es biotransformada; la mayor parte de la dosis se excreta intacta. Se han realizado estudios metabólicos en ratas y animales de abasto, en los que se han aislado con mayor frecuencia los metabolitos 24-OH-H2B1 y 24-OH-H2B1b (González *et al.*, 2009).

La eliminación ocurre principalmente a través de las heces (90%), proceso independiente de la vía de administración. La excreción renal alcanza un 2%. La bilis es la principal vía de excreción a lo cual contribuiría la P-gp la que favorecería el paso de la droga a los canalículos biliares. También se ha demostrado la eliminación a través de la glándula mamaria en vacas lecheras, ovejas y cabras (González *et al.*, 2009).

Los estudios farmacocinéticos requieren la detección de la droga en matrices animales. La literatura describe diversos procedimientos analíticos tanto en plasma (Pérez *et al.*, 2003) como en otros tejidos (Verduyts *et al.*, 2008).

La detección en plasma se basa en un procedimiento de extracción en fase líquida (Gokbulut *et al.*, 2006) o sólida (Pérez *et al.*, 2003). Los análisis se realizan por cromatografía líquida de alto rendimiento con

detección de fluorescencia (HPLC-FLUOR) (Gokbulut *et al.*, 2006), logrando sensibilidades de hasta 0,2 ng/ml en plasma (Al-Azzam *et al.*, 2007).

Actualmente, los métodos analíticos, aunque hayan sido desarrollados en otros laboratorios, deben ser validados de acuerdo a normas estándares. La normativa americana (FDA, 1996) especifica los procedimientos de validación y los parámetros a definir: tiempo de retención, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, recuperación y precisión.

Con el fin de darle un uso responsable a esta droga cuando se utiliza de manera *extraetiqueta*, se requiere conocer la farmacocinética en las especies animales de destino, aún cuando éstas no estén señaladas en las condiciones de registro. Esta información ayudará a optimizar su eficacia y seguridad clínica. Por otro lado, la caracterización cinética de la IVM puede ser usada para predecir y optimizar el valor de los efectos parasiticidas y para diseñar programas de control de parásitos en la población canina de nuestro país.

Es por esta razón que el objetivo de este estudio es comparar la farmacocinética del esquema terapéutico tradicionalmente utilizado para la DGC con el esquema que se utiliza en la actualidad en la clínica veterinaria y que ha demostrado ser más efectivo en el tratamiento de dicha patología.

Material y métodos

Este estudio contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET), Universidad de Chile.

Animales experimentales

Se utilizaron animales pertenecientes a la Asociación de Ayuda al Animal Abandonado (4A) de FAVET de la Universidad de Chile. Ocho perros mestizos de ambos sexos fueron asignados según peso corporal a dos grupos experimentales (Grupo A y Grupo B) de cuatro animales cada uno, de manera de obtener pesos promedio similares. Los criterios de inclusión de los animales al estudio fueron: edad entre 3 y 6 años, no presentar alteraciones en el examen clínico, hemograma y perfil bioquímico y no haber recibido tratamiento con ninguna lactona macrocíclica (en cualquiera de sus presentaciones comerciales, dosis o vía de administración) al menos en los 3 meses previos al estudio. Esto último se confirmó mediante la obtención de una muestra de sangre y el análisis cromatográfico de plasma para la detección de IVM.

Grupo A: n=4; 22,86 ± 4,73 kg peso corporal.

Grupo B: n=4; 23,86 ± 2,84 kg peso corporal.

Tratamientos y obtención de muestras

Los animales fueron trasladados al Hospital de Pequeños Animales de FAVET, dos días antes del estudio para la evaluación clínica, ambientación y control de las 12 horas de ayuno previo a la administración del fármaco.

Se utilizó IVM 1% y las dosis y vías de administración fueron las siguientes:

Grupo A: 200 µg/kg de peso de IVM vía s.c.

Grupo B: 600 µg/kg de peso de IVM vía p.o.

Previo a la administración del fármaco, se tomó una muestra de sangre control (Tiempo 0). Posteriormente se administró el

tratamiento en dosis única a cada grupo experimental, para luego obtener muestras de 5 a 10 ml de sangre, en tubos con heparina sódica (BD Vacutainer®) en los siguientes tiempos: 0,04; 0,08; 0,16; 0,25; 0,33; 0,5; 0,66; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 9; 12; 15; 20; 25; 30; 35 y 40 días post-administración. Para las 8 muestras obtenidas durante las primeras 24 horas se utilizó una bránula (21G, 1,5") y para el resto se utilizaron jeringas desechables (BD, 10 ml, 1,5"), con el fin de asegurar el bienestar de los animales durante todo el estudio.

Las muestras fueron centrifugadas (L.W.Scientific®, USA) a 1500g durante 20 minutos para obtener el plasma el cual fue almacenado en tubos Eppendorf a -20°C hasta el momento del análisis cromatográfico.

Los animales fueron monitoreados durante todo el experimento con el objeto de retirar del estudio todo ejemplar en caso de presentar cualquier signología clínica relacionada o no con el fármaco administrado y prestarle la atención médica necesaria.

Procedimiento analítico

Se realizó en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de FAVET, Universidad de Chile.

Las muestras de plasma fueron sometidas a un proceso de extracción en fase sólida, descrito por Gokbulut *et al.*, (2006) con modificaciones: a 1 ml de plasma fortificado (plasma canino con concentraciones conocidas de IVM) se agregó 1 ml de acetonitrilo (Fisher Scientific®), se agitó en vortex (Heidolph®, Multi Reax) durante 15 segundos, se agregó 5 ml de cloroformo (Merck®) y se agitó suavemente en vortex por 15 minutos. A continuación se centrifugó a 5000g por 20 minutos y la fase orgánica (3 ml) se transfirió a un tubo de vidrio. La muestra fue evaporada a 45°C bajo flujo de

nitrógeno y posteriormente derivatizada (metilimidazol:anhidroacético:dimetilformamida) (Merck®) en proporciones de 2:6:9. Posteriormente fue incubada a 90°C en horno (Memmert®) por 60 minutos y disuelta con cloroformo para la extracción en fase sólida (Sílica 500 mg, Sep-Pak® Vac, Waters®). La muestra fue evaporada nuevamente y luego reconstituida con 300 µl de metanol (Merck®).

Condiciones cromatográficas

Las muestras fueron analizadas por HPLC-FLUOR compuesto por una bomba (515, Waters®, USA), un autosampler (717, Waters®, Milford) y un detector de fluorescencia (2475, Waters®, USA) operado a longitud de excitación de 278 nm y de emisión de 440 nm. Los datos obtenidos fueron procesados por el software CSW32 Chromatography Station Properties, Versión 1.4.11.77. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna analítica C-18 Simmetry (250mm x 4,6 mm x 5 µm, Waters®).

Procedimiento de validación

La validación del método se realizó de acuerdo a la norma americana (FDA, 1996), utilizando curvas de calibración con muestras de plasma blanco (plasma obtenido de caninos que no habían recibido tratamiento con lactonas macrocíclicas) a las que se les agregó IVM. Esto se logró preparando diluciones del fármaco a partir de una solución madre (1 mg/ml) para alcanzar en plasma concentraciones de 0,2, 0,5, 1, 5, 10 y 20 ng/ml. Posteriormente fueron sometidas al proceso de extracción antes mencionado para finalmente construir curvas de calibración y calcular los parámetros de validación. Los parámetros analizados fueron: tiempo de retención, especificidad, linealidad, precisión,

recuperación, límite de detección y límite de cuantificación.

Análisis farmacocinético

Una vez obtenidas las concentraciones de IVM a través del tiempo de cada individuo, se realizó el cálculo de los parámetros farmacocinéticos según lo descrito por Schwartz y Pateman (2004):

Concentración máxima ($C_{máx}$) y Tiempo máximo ($T_{máx}$): se obtuvieron directamente de la observación de las curvas tiempo-concentración.

Constante de eliminación (λ_z): Fue estimada por una regresión lineal de la concentración transformada a logaritmo versus tiempo:

$\lambda_z =$ pendiente X- 2,303, donde el término 2,303 corresponde a una constante.

Vida media de eliminación ($T_{1/2}$): Fue calculada por la fórmula: $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$, donde $\ln 2$ equivale a 0,693.

Área bajo la curva (ABC):

- ABC_{final} : desde el tiempo cero (t_0) hasta el tiempo donde se encuentra la última concentración cuantificable. Fue calculada por una regla trapezoidal lineal.

- *Extrapolación de ABC_{final} desde el tiempo cero al infinito (ABC_{∞}):* fue calculada por la fórmula $ABC_{\infty} = (ABC_{final} + C_{final}) / \lambda_z$, donde C_{final} es la última concentración cuantificable observada.

Clearance (CL): Fue calculado con la fórmula

$$CL = \text{Dosis} / ABC_{\infty} \text{ o } \frac{0,693 \times V}{T_{1/2}}$$

Volumen de distribución (Vd): $V_z = CL / \lambda_z$

Análisis estadístico

Una vez obtenidos los parámetros farmacocinéticos de ambos grupos, fueron comparados estadísticamente por un análisis de la varianza (ANDEVA) utilizando el software InfoStat versión 2004.

Resultados

Con respecto a la validación del método, se puede señalar que todos los parámetros estudiados se encuentran dentro de lo exigido por la norma americana (FDA, 1996), lo que significa que la metodología analítica cumple con las especificaciones impuestas por la normativa utilizada. Los parámetros de validación se señalan en la tabla 1.

Por lo anterior, el método puede ser utilizado para la detección y cuantificación de IVM en muestras de plasma obtenidas de caninos tratados con IVM.

Tabla 1. Parámetros de validación del método analítico utilizado para detectar y cuantificar IVM en plasma canino. Se presentan los promedios y la desviación estándar (promedio \pm DS).

Parámetros de validación	IVM
Tiempo de retención (minutos)	23,69 \pm 0,11
Linealidad (r)*	0,996
Precisión	0,55 \pm 0,09* CV**= 16%
Recuperación (%)	52 - 114
Límite de detección (ng/ml)	0,46
Límite de cuantificación (ng/ml)	0,47

*(r): coeficiente de correlación; **CV: coeficiente de variación.

No se observaron reacciones adversas en los animales experimentales durante el estudio.

La IVM fue detectada desde 1 hora hasta 25 días post-administración en el caso de la vía p.o.; y entre 1 hora y 40 días post-administración en la vía s.c. Las concentraciones detectadas en cada animal incluido en el estudio, se detallan en la tabla 2.

En la tabla 3 se presentan los parámetros farmacocinéticos para cada dosis y vía de administración y el resultado del análisis de la varianza.

Con respecto a la $C_{m\acute{a}x}$ y $T_{m\acute{a}x}$ se alcanzaron mayores concentraciones y en menor tiempo cuando la IVM fue administrada en dosis de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía p.o. ($C_{m\acute{a}x}$ 276,04 \pm 34,47 ng/ml y $T_{m\acute{a}x}$ 0,27 \pm 0,16 días) (promedio \pm DS) comparado con la dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía s.c. ($C_{m\acute{a}x}$ 58,90 \pm 10,26 ng/ml y $T_{m\acute{a}x}$ 2,50 \pm 0,58 días). Para ambos parámetros, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las distintas dosis y vías de administración.

El ABC_{final} fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en la dosis de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía p.o. (573,66 \pm 154,60 ng/día/ml) comparado con la dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía s.c. (332,10 \pm 92,73 ng/día/ml); lo mismo ocurre en el caso del ABC_{∞} donde se observa que cuando se utilizó la dosis de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía p.o. los resultados fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) (580,77 \pm 155,63 ng/día/ml) comparados con la dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía s.c. (345,24 \pm 96,55 ng/día/ml).

La dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía s.c. presentó un clearance significativamente más bajo ($p < 0,05$) (615,87 \pm 175,64 ml/kg/día) que la dosis de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía p.o. (1087,96 \pm 276,64 ml/kg/día). Las concentraciones obtenidas después de la administración de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía s.c. y 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vía p.o. de IVM son comparadas en la figura 2.

Tabla 2. Concentraciones de IVM obtenidas pre y post-administración en Grupo A (200 µg/kg de peso vía s.c.) y en Grupo B (600 µg/kg de peso vía p.o.).

Tiempo de muestreo (días) y grupo (A y B)		Concentraciones de IVM (ng/ml) en plasma obtenidas en los cuatro perros de cada grupo			
0	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
0,04	A	0,4	5,2	0,9	0,5
	B	168,6	260,5	171,2	191,0
0,08	A	0,8	5,7	5,3	1,2
	B	228,7	195,2	208,0	180,9
0,16	A	12,2	13,5	6,8	1,8
	B	320,8	260,8	234,3	281,7
0,25	A	0,6	17,0	5,6	2,4
	B	307,2	166,5	240,2	272,4
0,33	A	2,2	28,5	37,8	6,6
	B	268,4	215,3	189,2	247,2
0,5	A	6,9	42,6	53,7	10,7
	B	269,8	184,2	191,6	282,4
0,66	A	11,7	37,4	22,6	3,6
	B	265,1	68,1	213,4	218,1
1	A	10,3	55,3	41,7	7,9
	B	172,0	119,0	80,1	131,2
1,5	A	12,6	27,8	23,3	8,2
	B	135,3	107,1	83,3	140,1
2	A	43,8	62,4	71,8	41,2
	B	111,0	84,2	64,4	113,5
3	A	49,8	42,2	56,9	51,5
	B	77,4	54,3	39,0	94,4
4	A	41,9	28,6	44,6	41,4
	B	21,5	17,7	25,7	33,6
6	A	26,6	13,0	29,3	25,8
	B	12,8	9,0	13,9	24,2
9	A	8,3	5,6	10,7	15,8
	B	8,7	5,8	12,7	17,2
12	A	3,6	1,9	3,8	13,2
	B	3,6	3,7	8,7	16,6
15	A	2,9	2,5	9,8	10,7
	B	2,0	1,3	5,5	9,9
20	A	1,5	0	4,4	6,7
	B	0	0	1,5	5,5
25	A	0	0	3,2	2,7
	B	0	0	0	1,5
30	A	0	0	2,4	0
	B	0	0	0	0
35	A	0	0	1,7	0
	B	0	0	0	0
40	A	0	0	1,5	0
	B	0	0	0	0

Discusión y conclusiones

La IVM es una droga comúnmente utilizada por los médicos veterinarios ya que está clasificada como un potente endectocida que tiene un amplio rango terapéutico, debido a la presencia de la P-gp en la BHE, la que funciona como una bomba de eflujo transmembrana que limita la entrada de droga al cerebro, protegiéndolo contra la neurotoxicidad. En general esta droga tiene un amplio margen de seguridad (Mealey, 2004).

Existen en la literatura internacional numerosos estudios acerca de la farmacocinética de esta droga en diferentes especies animales tales como: bovinos (Vercruyssen *et al.*, 2008), equinos (Pérez *et al.*, 2003; Gokbulut *et al.*, 2010), ovinos (El-Banna *et al.*, 2008), caprinos (Gokbulut *et al.*, 2009), porcinos (González *et al.*, 2009), entre otros; sin embargo, para el caso de los caninos, existen sólo algunos estudios donde se evalúa la farmacocinética de la droga, administrada vía s.c. en dosis de 200 µg/kg de peso (Gokbulut *et al.*, 2006) y administrada vía p.o. en dosis que fluctúan entre los 200 µg/kg de peso (Gokbulut, *et al.*, 2006) y 250 µg/kg de peso (Al-Azzam *et al.*, 2007) hasta los 500 µg/kg de peso (Clark *et al.*, 2004) como máximo. Existen bastantes estudios clínicos que evalúan la eficacia de la dosificación de 600 µg/kg de peso vía p.o., pero hay escasa información sobre la cinética de esta dosificación; es por esta razón que este estudio buscó evaluar el comportamiento farmacocinético de esta droga en dosis de 600 µg/kg de peso vía p.o. al ser éste el esquema que se utiliza comúnmente hoy en la clínica de animales pequeños para tratar la DGC. Además, se realizó una comparación con la dosificación de 200 µg/kg de peso vía s.c., que es el esquema que se utilizaba

tradicionalmente para esos fines. Este estudio también toma importancia, ya que se trata de un uso *extraetiqueta* de la droga, debido a que en Chile no se encuentra registrada para su uso en animales pequeños, existiendo un riesgo con la dosis administrada, ya sea en individuos con expresión normal de la P-gp como también en aquellas razas genéticamente sensibles a la droga.

La administración p.o. de formulaciones parenterales de IVM ha demostrado tener una absorción más rápida y niveles plasmáticos más altos comparada con la administración vía s.c. en perros (Gokbulut *et al.*, 2006). Más aún, para el tratamiento de la DGC se administra la dosis de 600 µg/kg de peso vía p.o. diariamente durante al menos un mes lo que

ocasiona una acumulación de la droga en el organismo debido a sus características farmacocinéticas (Mueller, 2004; González *et al.*, 2009).

La FDA señala que hay una alta frecuencia de reacciones adversas al medicamento (RAMs) en perros a los que se les administra oralmente este fármaco (FDA, 2009), a modo de ejemplo en Chile existe un estudio que señala que un 4,7% de los perros tratados con IVM vía p.o. presenta una o más reacciones adversas, sugiriendo que el uso *extraetiqueta* de esta droga puede ser considerando un factor importante causante de las RAMs en los perros tratados (Iragüen *et al.*, 2010).

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos (promedio ± DS) de IVM obtenidos después de la administración de 200 µg/kg de peso vía s.c (Grupo A) y 600 µg/kg de peso vía p.o. (Grupo B) y resultados del análisis de la varianza (p-value).

Parámetros farmacocinéticos	Grupo A	Grupo B	p- value
C _{máx} (ng/ml)	58,90 ± 10,26	276,04 ± 34,47	<0,0001*
T _{máx} (días)	2,50 ± 0,58	0,27 ± 0,16	0,0003*
K _{el}	0,17 ± 0,10	0,23 ± 0,03	0,3685
T _{1/2} (días)	4,89 ± 1,94	3,12 ± 0,41	0,1230
ABC _{final} (ng/día/ml)	332,10 ± 92,73	573,66 ± 154,60	0,0365*
ABC _∞ (ng/día/ml)	345,24 ± 96,55	580,77 ± 155,63	0,0422*
CL (ml/kg/día)	615,87 ± 175,64	1087,96 ± 276,64	0,0280*
Vd (L/kg)	4,06 ± 1,56	4,81 ± 0,94	0,4449

* cuando p<0,05 las diferencias son estadísticamente significativas.

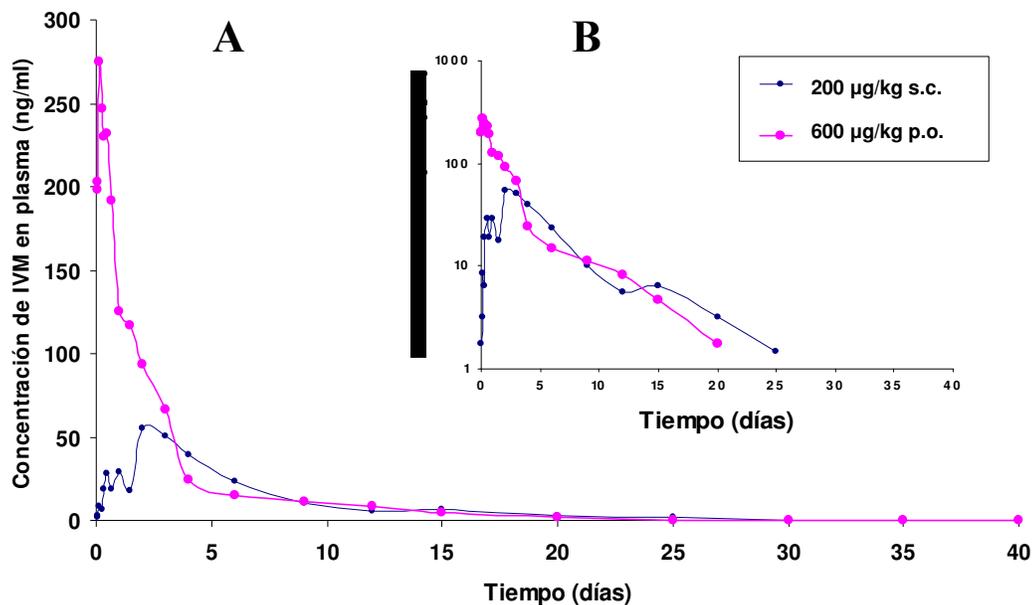


Figura 2. Panel A: Concentraciones de ivermectina (IVM) en plasma después de la administración de 200 µg/kg de peso vía s.c (Grupo A) y 600 µg/kg de peso vía p.o. (Grupo B). Panel B: Concentraciones de IVM en plasma vs. tiempo en escala semilogarítmica.

Existe un estudio acerca de la toxicosis de IVM en perros donde se señala que puede aparecer signología clínica en animales que recibieron dosis terapéuticas (Merola *et al.*, 2009). Además, se describe el caso de un perro de raza Pastor Australiano al que se le administró una dosis de 167 µg/kg de peso vía p.o. de un producto formulado para ganado, resultando el perro con una grave intoxicación (Hopper *et al.*, 2002).

También se estableció que para los individuos de raza Beagle la dosis letal 50 (LD₅₀) se encuentra alrededor de los 80 mg/kg de peso y la dosis más alta que se puede administrar en esta raza, en una única administración, sin que se observen clínicamente efectos adversos es de 2 mg/kg de peso (Hopper *et al.*, 2002).

Es importante también tener presente los estudios que señalan la susceptibilidad de algunas razas como por ejemplo los Collies,

Pincher y Old England Sheepdog donde se observa que la administración de dosis terapéuticas provocan neurotoxicidad en individuos genéticamente susceptibles (Edwards, 2003; Mealey, 2004).

Una dosis de 50-60 µg/kg de peso ha resultado ser segura en individuos de raza Collie que son reconocidamente susceptibles a la droga (Hopper *et al.*, 2002).

Pese a la mayor sensibilidad que pueden presentar las razas mencionadas, no se debe descartar la posibilidad que perros de otra raza o mestizos presenten signos de toxicidad aún cuando se hayan utilizado dosis terapéuticas. La literatura señala que la signología es similar, cursando estos animales con midriasis, temores, ataxia y anorexia (Edwards, 2003).

En el presente estudio podemos concluir que cuando IVM se administra en dosis única de 600 µg/kg de peso vía p.o. se

alcanzan mayores concentraciones plasmáticas y más rápidamente que cuando es administrada vía s.c., pero también ésta se elimina más rápido.

Debido a que existen estudios en la literatura internacional que señalan que la dosis de 600 µg/kg de peso vía p.o. es altamente efectiva como tratamiento de la DGC cuando se administra diariamente, pero que puede provocar cuadros de toxicosis leve luego de 6 semanas de uso (Ristic *et al.*, 1995), podríamos señalar a modo de conclusión, que la dosificación de 600 µg/kg de peso vía p.o. es eficaz en el tratamiento de dicha patología y, que la dosis única no provocó reacciones adversas en los animales experimentales. No obstante, es necesario estudiar el comportamiento acumulativo de la droga en el organismo cuando ésta se administra en dosis múltiples a caninos, ya que, las altas concentraciones plasmáticas reflejadas en la administración p.o. expone a los pacientes a presentar reacciones adversas a este medicamento, obligando a un monitoreo constante durante la terapia.

En general se recomienda que, al utilizar un fármaco de manera *extraetiqueta*, se considere la menor dosis posible.

Trabajos futuros deberían analizar la posibilidad de disminuir la dosis hasta conjugar apropiadamente la eficacia con la seguridad. Una alternativa sería por ejemplo utilizar el protocolo señalado por Paterson *et al.* (2009) donde se administra 500 µg/kg de peso vía p.o. cada 24 horas, o bien, espaciar las administraciones, con el fin de evitar que la acumulación llegue a niveles peligrosos para la salud y el bienestar del animal.

Adicionalmente, es necesario contar con una formulación oral de IVM para caninos, con los estudios de seguridad y cinéticos adecuados.

Agradecimientos

A todos quienes trabajan en el Laboratorio de Farmacología, FAVET, Universidad de Chile, por su ayuda, especialmente a mi profesora guía por su cariño y paciencia y las profesoras consejeras por su apoyo; a la Asociación de Ayuda al Animal Abandonado (4A) por facilitarme a los animales que este estudio requería; a todos los ayudantes que tuve en este experimento; a mi familia y mi novio a los que adoro porque siempre me apoyaron incondicionalmente y a mis amigas y amigos de la U, ya que con ellos recorrí este largo camino que hoy termina y gracias a ellos me llevo los mejores recuerdos de esta hermosa etapa de mi vida.

Referencias bibliográficas

- AL-AZZAM, S.; FLECKENSTEIN, L.; CHENG, K.; DZIMIANSKI, M.; McCALL, J.** 2007. Comparison of the pharmacokinetics of moxidectin and ivermectin after oral administration to Beagle dogs. *Biopharm. Drug. Dispos.* 28:431-438
- CLARK, S.; CROWLEY, A.; SCHMIDT, P.; DONOGHUE, A.; PICHÉ, C.** 2004. Long-term delivery of ivermectin by use of poly (D,L-lactyc-co-glycolic) acid microparticles in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 65:752-757.
- DOURMISHEV, A.; DOURMISHEV, L.; SCHWARTZ, R.** 2005. Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. *Int. J. Dermatol.* 44: 981-988.
- EL-BANNA, H.; GOUDAH, A.; EL-ZORBA, H.; ABD-EL-RAHMAN, S.** 2008. Comparative pharmacokinetics of ivermectina alone and a novel formulation of ivermectin and rafoxanide in calves and sheep. *Parasitol. Res.* 102:1337-1342.

- EDWARDS, G.** 2003. Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity?. *Filaria J.* 2 suppl 1:S8.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA).** 1996. Guidance for industry. Q2 Validation of Analytical Procedures: Methodology. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 10p.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA).** 2009. Cumulative veterinary adverse event (ADE) reports. [en línea]. <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/ProductSafetyInformation/ucm055394.htm>> [consulta: 04-05-2009]
- GOKBULUT, C.; KARADEMIR, U.; BOYACIOGLU, M.; McKELLAR, A.** 2006. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. *Vet. Parasitol.* 135:347-354.
- GOKBULUT, C.; BILGILI, A.; HANEDAN, B.; AKSIT, D.; AKSOY, A.; TURGUT, C.** 2009. Breed-related plasma disposition of ivermectin following subcutaneous administration in Kilis and Damascus goats. *Res. Vet. Sci.* 87:445-448.
- GOKBULUT, C.; CIRAK, V.; SENLIK, B.; AKSIT, D.; DURMAZ, M.; McKELLAR, Q.** 2010. Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses. *Vet. Parasitol.* 170:120-126
- GONZÁLEZ, A.; SAHAGÚN, A.; DIEZ, M.; FERNÁNDEZ, N.; SIERRA, M.; GARCÍA, J.** 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Vet. J.* 179:25-37.
- HOPPER, K.; ALDRICH, J.; HASKINS, S.** 2002. Ivermectin toxicity in 17 Collies. *J. Vet Intern. Med.* 16:89-94.
- INFOSTAT** (2004). InfoStat Versión 2004. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- IRAGÜEN, D.; URCELAY, S.; SAN MARTÍN, B.** 2010. Pharmacovigilance in veterinary medicine in Chile: a pilot study. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* En Prensa.
- KAYA, D.; INCEBOZ, T.; KOLATAN, E.; GÜNELI, E.; YILMAZ, O.** 2010. Comparison of efficacy of ivermectin and doramectin against mange mite (*Sarcoptes scabiei*) in naturally infested rabbits in Turkey. *Vet. Ital.* 46:51- 56.
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; IMPERALE, F.; PIS, A.; LANUSSE, C.** 2002. Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. In: Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Botana, L. M.; Landoni, F.; Martín-Jiménez, T. (Eds.). Primera edición. Mc Graw-Hill/ Interamericana de España. Madrid. España. pp. 545-558.
- MEALEY, K.** 2004. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27:257-264.
- MEROLA, V.; KHAN, S.; GWALTNEY-BRANT, S.** 2009. Ivermectin toxicosis in dogs: a retrospective study. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 45:106-111.
- MORENO, C.** 2009. Evaluación de la eficacia del tratamiento con ivermectina oral en pacientes caninos afectados por demodicosis generalizada. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 70p.
- MUELLER, R.** 2004. Treatment protocols for demodicosis: an evidence-based review. *Vet. Dermatol.* 15: 75–89.
- PARADIS, M.** 1999. New approaches to the treatment of canine demodicosis. *Vet. Clin. N. Am. Small.* 29:1425-1436.

- PATERSON, T.; HALLIWELL, R.; FIELDS, P.; LOUW, M.; LOUW, J.; BALL, G.; PINCKNEY, R.; MCKIBBEN, J.** 2009. Treatment of canine-generalized demodicosis: a blind, randomized clinical trial comparing the efficacy of Advocate (Bayer Animal Health) with ivermectin. *Vet. Dermatol.* 20:447-455.
- PÉREZ, R.; GODOY, C.; PALMA, C.; CABEZAS, I.; MUÑOZ, L.; RUBILAR, R.; ARBOIX, M.; ALVINERIE, M.** 2003. Plasma profiles of ivermectin in horses following oral or intramuscular administration. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50: 297-302.
- RISTIC, Z.; MEDLEAU, L.; PARADIS, M.; WHITEWEITHERS, N.** 1995. Ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207:1308-1310.
- SCHWARTZ, S.; PATEMAN, T.** 2004. Pre-clinical pharmacokinetics. *In: A handbook of bioanalysis and drug metabolism.* Evans, G. (Ed.). CRC Press, United States.
- SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO DE CHILE (SAG).** 2010. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. [en línea]. <http://laima.sag.cl/AppSag/public/medicamentos/medicamentos_BL.jsp> [consulta: 24-03-2010].
- VERCRUYSE, J.; DEPREZ, P.; EVERAERT, D.; BASSISSI, F.; ALVINERIE, M.** 2008. Breed differences in the pharmacokinetics of ivermectin administered subcutaneously to Holstein and Belgian Blue calves. *Vet. Parasitol.* 152: 136-140.