



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

**Efectos del estado inflamatorio inducido por lipopolisacárido de *Escherichia coli* O128:B12 sobre la disposición plasmática y la distribución tisular de ivermectina en ovinos**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

JOSÉ BELARMINO RIQUELME ACUÑA  
CHILLÁN-CHILE  
2022

Profesor Guía: Rubén Pérez Fernández  
Dpto. de Ciencias Clínicas  
Facultad de Ciencias Veterinaria  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

---

Dr. Rubén Pérez Fernández  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Daniel Sandoval Silva  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

---

Dr. Pablo Torres Vergara  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dr. Fidel Castro Reboredo  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis fue financiada por: Proyecto FONDECYT N° 1130473 (2014-2017).

Beca CONICYT para estudios de doctorado nacional (2015-2019).

Laboratorio de Farmacología Veterinaria, Departamento de Ciencias Clínicas,  
Universidad de Concepción.

*A Patricia a Feñita a mis padres y hermana*

*A mi familia y a mi familia adoptiva.*

*A mis profesores y a mis amigos*

*A todos los que han contribuido de una u otra forma a mi vida.*

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II REVISIÓN BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>1 PARASITISMO GASTROINTESTINAL .....</b>	<b>4</b>
1.1 Fisiopatología del PGI.....	5
<b>2. CONTROL DEL PARASITISMO GASTROINTESTINAL.....</b>	<b>8</b>
2.1 Uso de antihelmínticos .....	8
2.2 Lactonas macrocíclicas (LM) .....	8
2.3 Farmacocinética de IVM en ovinos .....	13
2.4 Efecto del parasitismo en la farmacocinética de IVM .....	15
<b>3. RESPUESTA DE FASE AGUDA INDUCIDA POR PATOGENOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 Rol del Lipopolisacárido (LPS) en la RFA .....	21
3.2 Mecanismo de acción del LPS .....	23
3.3 Vías de transducción del LPS .....	25
<b>4. CAMBIOS FISIOLÓGICOS DURANTE LA RFA .....</b>	<b>26</b>
4.1 Cambios Neuroendocrinos.....	26
4.2 Cambios en la concentración de las proteínas de fase aguda (PFA) .....	29
4.3 Cambios hematológicos y en la bioquímica sanguínea .....	31
<b>5 RESPUESTA DE FASE AGUDA Y SU EFECTO SOBRE LA     FARMACOCINÉTICA DE LOS FÁRMACOS .....</b>	<b>33</b>

5.1 Mecanismo de transporte de fármacos en biomembranas .....	35
5.2 Efecto de la RFA en la expresión de la gp-P.....	37
5.3 Rol de la gp-P en la farmacocinética de IVM.....	39
III.    PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
HIPÓTESIS: .....	43
OBJETIVOS GENERALES:.....	43
OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....	43
IV.    MATERIALES Y MÉTODO.....	45
Lugar de trabajo .....	45
Condiciones Generales.....	46
Diseño experimental.....	47
Objetivo 1: Determinar el efecto de la administración de una dosis de 1 µg/kg lipopolisacárido de <i>E. coli</i> sobre las variables hematológicas, fisiológicas y bioquímicas en ovinos. ....	47
Objetivo 2: Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de <i>E. coli</i> sobre la disposición plasmática de Ivermectina administrada por vía intravenosa (IV) en ovinos.....	49
Objetivo 3: Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de <i>E. coli</i> sobre la farmacocinética plasmática y la distribución tisular de Ivermectina administrada por vía subcutánea (SC) en ovinos. ....	51
Objetivo 4: Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de <i>E. coli</i> sobre la farmacocinética plasmática de Ivermectina administrada por vía intraruminal (IR) en ovinos.....	54

<b>Condiciones Experimentales.....</b>	<b>56</b>
<b>Registro de las Constantes Fisiológicas.....</b>	<b>56</b>
<b>Recolección de muestras sanguíneas.....</b>	<b>57</b>
<b>Determinación de las variables hematológicas, bioquímicas y marcadores inflamatorios .....</b>	<b>57</b>
<b>Análisis del Hemograma.....</b>	<b>57</b>
<b>Análisis del Perfil Bioquímico .....</b>	<b>57</b>
<b>Procedimientos analíticos .....</b>	<b>58</b>
<b>Extracción en fase sólida .....</b>	<b>59</b>
<b>Condiciones cromatográficas .....</b>	<b>60</b>
<b>Validación de la metodología analítica.....</b>	<b>60</b>
<b>Análisis farmacocinético .....</b>	<b>60</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>62</b>
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>Efecto de la administración de una dosis de 1 µg/kg por vía intravenosa de lipopolisacárido de <i>E. coli</i> sobre las variables hematológicas, fisiológicas y bioquímicas en ovinos. ....</b>	<b>63</b>
<b>Efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de <i>E. coli</i> sobre la disposición plasmática de Ivermectina administrada por vía intravenosa (IV) en ovinos. ....</b>	<b>73</b>
<b>Efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de <i>E. coli</i> sobre la disposición plasmática y distribución tisular de Ivermectina administrada por vía subcutánea (SC) en ovinos.....</b>	<b>80</b>

<b>Efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de <i>E. coli</i> sobre la disposición plasmática de Ivermectina administrada por vía intraruminal (IR) en ovinos.....</b>	<b>87</b>
<b>VI CONCLUSIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ....</b>	<b>96</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Estructura química de ivermectina (Extraído de Kiki-Mvouaka et al., 2010).....	<b>10</b>
<b>FIGURA 2:</b> Fisiología de los cambios celulares generados durante la RFA (Extraído de Cray <i>et al.</i> , 2009).....	<b>19</b>
<b>FIGURA 3:</b> Estructura del Lipopolisacárido (Extraído de Bermejo and Duarte., 2003).....	<b>22</b>
<b>FIGURA 4:</b> Esquema general de la señalización LPS / TLR-4. El reconocimiento del LPS es facilitado por LBP y CD14, y está mediada por complejo receptor TLR-4/ MD-2 (Extraído y modificado de Lu et al., 2008).....	<b>24</b>
<b>FIGURA 5:</b> Esquema de extracción de muestras sanguíneas. HG: Hemograma, ILs: Interleucinas, PB: Perfil bioquímico.....	<b>49</b>
<b>FIGURA 6:</b> Esquema experimental para la extracción de muestras luego de la administración de IVM por vía intravenosa en ovinos.....	<b>51</b>
<b>FIGURA 7:</b> Esquema experimental para la extracción de muestras luego de la administración de IVM por vía subcutánea en ovinos.....	<b>54</b>
<b>FIGURA 8:</b> Esquema experimental para la extracción de muestras luego de la administración de IVM por vía IR en ovinos.....	<b>56</b>
<b>FIGURA 9:</b> Promedio de temperatura rectal (a), frecuencia cardíaca (b) y frecuencia respiratoria (c) en ovejas del grupo control y las tratadas LPS de <i>E. coli</i> LPS (n = 5).....	<b>68</b>
<b>FIGURA 10:</b> Recuento de Leucocitos totales (Nº de leucocitos $\mu\text{L}^{-1}$ ) (a), recuento de neutrófilos (Nº de neutrófilos $\mu\text{L}^{-1}$ ) (b), recuento de Monocitos (Nº de monocitos $\mu\text{L}^{-1}$ ) (c), recuento de linfocitos (Nº de linfocitos $\mu\text{L}^{-1}$ ) (d) en ovejas de control y tratadas con LPS de <i>E. coli</i> (n = 5).....	<b>71</b>

**FIGURA 11:** Concentraciones plasmáticas medias de ivermectina administradas por vía intravenosa a dosis de 0,2 mg/kg en ovinos controles y en ovinos tratados con LPS con *E. coli* (n = 5). ..... **74**

**FIGURA 12:** Concentraciones plasmáticas medias de ivermectina administradas por vía Subcutánea a dosis de 0,2 mg/kg en ovinos control y ovinos tratados con LPS con *E. coli* (n = 5). ..... **82**

**FIGURA 13:** Concentraciones plasmáticas medias de ivermectina administradas por vía intraruminal a dosis de 0,2 mg/kg en ovinos controles y en ovinos tratados con LPS con *E. coli* (n = 5) ..... **89**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1:</b> Parámetros farmacocinéticos de IVM en diferentes especies animales tras la administración IV (Extraído y modificado de McKellar and Gokbulut, 2012) .....	4
<b>TABLA 2:</b> Estudios en los que se ha usado el LPS con la finalidad de conocer el efecto de la RFA sobre la farmacocinética de los fármacos .....	35
<b>TABLA 3:</b> Media $\pm$ SEM del volumen globular, hemoglobina, recuento de plaquetas, actividad enzimática AST y GGT en ovinos del grupo control y en ovinos tratadas con LPS de <i>Escherichia coli</i> . .....	72
<b>TABLA 4:</b> Parámetros farmacocinéticos de ivermectina después de la administración intravenosa de 0,2 mg/kg de peso corporal en ovinos controles y en ovinos tratados con LPS de <i>E. coli</i> (n = 5). .....	76
<b>TABLA 5:</b> Parámetros farmacocinéticos de ivermectina después de la administración subcutánea de 0,2 mg/kg de peso corporal en ovinos control y tratados con LPS de <i>E. coli</i> (n = 5). .....	84
<b>TABLA 6:</b> Concentraciones tisulares de ivermectina después de la administración subcutánea de 0,2 mg/kg de peso corporal en ovinos controles y ovinos tratadas con LPS de <i>E. coli</i> (n = 5) .....	85
<b>TABLA 7:</b> Parámetros farmacocinéticos de ivermectina después de la administración intraruminal de 0,2 mg/kg de peso corporal en ovinos control y tratados con LPS de <i>E. coli</i> (n = 5). .....	90

## RESUMEN

EFFECTOS DEL ESTADO INFLAMATORIO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO DE *Escherichia coli* O128:B12 SOBRE LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA Y LA DISTRIBUCIÓN TISULAR DE IVERMECTINA EN OVINOS.

Antecedentes actuales demuestran que la farmacocinética de antimicrobianos puede ser modificada en animales que estén cursando con un proceso inflamatorio derivado de la acción de agentes patógeno causantes de una infección. Esto se debe a alteraciones en la expresión de proteínas con función enzimática y/o transportadora, lo cual puede modificar el perfil farmacocinético, la distribución tisular pudiendo alterar la eficacia y seguridad del antimicrobiano. La respuesta orgánica a la infección se caracteriza por una reacción sistémica conocida como respuesta de fase aguda (RFA), la que comprende un conjunto de reacciones metabólicas y fisiológicas que forman parte del sistema de defensa temprana y/o sistema inmune innato del huésped y que puede ser activado por diferentes estímulos entre los que destaca el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*. Para conocer el efecto de la administración de LPS sobre variables fisiológicas, hematológicas y bioquímicas, dos grupos de ovinos se distribuyeron en un grupo experimental (n = 5) tratado con 3 dosis intravenosas de 1 µg/kg de LPS y grupo control (n = 5) tratado con solución salina (SS) a igual volumen y frecuencia que el grupo experimental. Se monitoreó; Temperatura corporal (T°C), frecuencia cardíaca (FC) y frecuencia respiratoria (FR). Se tomaron muestras de sangre para hemograma y determinar actividad enzimática para aspartato amino transferasa (AST) y gamma glutamil transferasa (GGT) entre 1 y 24 h post-LPS. Las ovejas tratadas con LPS presentaron valores medios de T°C ( $41,2 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ ), FC ( $132 \pm 12,3$  latidos/min) y FR ( $107,2 \pm 25$  ciclos/min) superiores a los observados en ovinos controles ( $39,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ,  $88,8 \pm 8,7$  latidos/min y  $53,6 \pm 17,1$  ciclos/min respectivamente). Entre las 4 y 8 horas posterior a la inyección de LPS, el recuento de leucocitos se asoció

a linfopenia, seguida de leucocitosis a las 24 horas. Estos resultados permiten caracterizar la respuesta de fase aguda inducida por LPS en ovinos, por lo que representan un modelo útil para estudiar la farmacocinética de ivermectina en respuesta a una infección.

La ivermectina (IVM) es un antiparasitario ampliamente usado en medicina veterinaria y que se aplica a un gran número de animales entre los cuales es posible encontrar aquellos que estén cursando un cuadro inflamatorio asociado a un proceso infeccioso. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del estado inflamatorio inducido por lipopolisacárido de *Escherichia coli* sobre la disposición plasmática de ivermectina cuando se administra por vía endovenosa, subcutánea e intraruminal en ovinos. Para ello se realizaron tres experimentos, en cada uno de los cuales se distribuyeron dos grupos experimentales de ovejas Suffolk Down: Grupo 1 (LPS, n =5): tratado con tres dosis de LPS de 1 µg/kg a -24, -16 y -0,75 h previo a la administración de IVM; grupo 2 (Control, n =5): tratados con SS. A los 45 minutos posteriores a la tercera dosis de LPS o SS se administraron 0,2 mg de IVM/kg vía intravenosa (IV), subcutánea (SC) o intraruminal (IR) para cada uno de los experimentos. En otro grupo de 12 ovinos, los que siguieron el mismo régimen de tratamiento experimental con LPS o SS se administró IVM por vía SC y a los 2 días post-administración de IVM los animales fueron sometidos a eutanasia para la recolección de tejidos y evaluar la distribución tisular del fármaco. Las concentraciones de plasmáticas y tisulares de IVM se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados mediante un modelo no compartimental.

En cuanto a la IVM administrada por vía IV en ovejas control, los valores de los parámetros farmacocinéticos fueron los siguientes: vida media de eliminación (2,85 días), tiempo medio de residencia (TMR) (2,27 días), área bajo la curva de concentración plasmática a través del tiempo (ABC) (117,4 ng·día/mL), volumen de distribución (875,6 mL/kg) y aclaramiento (187,1 mL/día).

Para IVM SC, los valores de los parámetros farmacocinéticos fueron los siguientes para ovejas sanas: vida media de eliminación (10,2 días), TMR (12,38 días), ABC (211,34 ng-día/mL). Finalmente, para IVM IR se encontraron los siguientes valores de los parámetros farmacocinéticos en ovejas sanas: vida media de eliminación (2,38 días), TMR (2,87 días), ABC (45,96 ng-día/mL). Para los parámetros farmacocinéticos estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar con los resultados obtenidos en el grupo de ovinos tratados con LPS respecto a los observados en el grupo control. En cuanto a las concentraciones plasmáticas de IVM, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para la vía IV cuando se compararon ovinos control con ovinos tratados con LPS. En cambio, para la vía SC, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de ovinos a las 24 horas de administrada la IVM, siendo menores en el grupo tratado con LPS. La administración IR de IVM en ovinos tratados con LPS produjo disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de IVM con respecto al grupo control 12 horas post administración del fármaco. Tanto para la vía SC como para la vía IR, las diferencias fueron observadas en la fase de absorción del fármaco. Con respecto a la distribución tisular de IVM posterior a la administración por vía SC, las mayores concentraciones en ovejas sanas se observaron en la bilis (165,8 ng/mL), hígado (56,7 ng/g) y riñón (22,8 ng/g), no observándose diferencias con los ovinos tratados con LPS.

Se concluye que la RFA inducida por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* en ovinos adultos, no produjo cambios en los parámetros farmacocinéticos de IVM cuando esta se administra por vía IV, SC e IR, ni en la distribución tisular de IVM cuando se administra por vía SC, por lo que su administración en dosis terapéuticas es segura en ovinos que cursen un cuadro inflamatorio derivado de un proceso infeccioso.

## ABSTRACT

EFFECTS OF THE INFLAMMATORY STATE INDUCED BY LIPOPOLYSACCHARIDE OF *Escherichia coli* O128:B12 ON PLASMA DISPOSITION AND TISSUE DISTRIBUTION OF IVERMECTIN IN SHEEP.

Current background shows that the pharmacokinetics of antimicrobials can be modified in animals that are undergoing an inflammatory process derived from the action of pathogenic agents that cause an infection. This is due to alterations in the expression of proteins with an enzymatic and/or transporter function, which can modify the pharmacokinetic profile, tissue distribution and can alter the efficacy and safety of the antimicrobial. The organic response to infection is characterized by a systemic reaction known as the acute phase response (APR), which comprises a set of metabolic and physiological reactions that are part of the early defense system and/or innate immune system of the host and that it can be activated by different stimuli, among which the lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* stands out. In order to know the effect of LPS administration on physiological, hematological and biochemical variables, two groups of sheep were divided into an experimental group (n = 5) treated with 3 intravenous doses of 1 µg/kg of LPS and a control group (n = 5) treated with saline solution (SS) at the same volume and frequency as the experimental group. It was monitored; Body temperature (T°C), heart rate (HR) and respiratory rate (RR). Blood samples were taken for complete blood count and to determine enzymatic activity for aspartate amino transferase (AST) and gamma glutamyl transferase (GGT) between 1 and 24 h post-LPS. Sheep treated with LPS presented mean values of T°C ( $41,2 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ ), HR ( $132 \pm 12,3$  beats/min) and RR ( $107,2 \pm 25$  cycles/min) higher than those observed in control sheep ( $39,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ,  $88,8 \pm 8,7$  beats/min and  $53,6 \pm 17,1$  cycles/min, respectively). Between 4 and 8 hours after LPS injection, the white blood cell count was associated with lymphopenia, followed by leukocytosis at 24 hours. These results allow characterizing the acute phase response induced

by LPS in sheep, thus representing a useful model to study the pharmacokinetics of ivermectin in response to infection.

Ivermectin (IVM) is a widely used antiparasitic in veterinary medicine and is applied to a large number of animals, among which it is possible to find those that are experiencing an inflammatory condition associated with an infectious process. The objective of the study was to evaluate the effect of the inflammatory state induced by lipopolysaccharide of *Escherichia coli* on the plasma disposition of ivermectin when administered intravenously, subcutaneously and intraruminally in sheep. For this, three experiments were carried out, in each of which two experimental groups of Suffolk Down sheep were distributed: Group 1 (LPS, n =5): treated with three doses of LPS of 1 µg/kg at -24, -16 and -0,75 h prior to IVM administration; group 2 (Control, n=5): treated with SS. Forty-five minutes after the third dose of LPS or SS, 0,2 mg IVM/kg were administered intravenously (IV), subcutaneously (SC), or intraruminally (IR) for each of the experiments. In another group of 12 sheep, those that followed the same experimental treatment regimen with LPS or SS, IVM was administered SC and 2 days after IVM administration the animals were euthanized for tissue collection and to evaluate the distribution drug tissue. Plasma and tissue concentrations of IVM were determined by high performance liquid chromatography. Pharmacokinetic parameters were calculated using a non-compartmental model.

Regarding the IVM administered intravenously in control sheep, the values of the pharmacokinetic parameters were the following: elimination half-life (2,85 days), mean residence time (MRT) (2,27 days), area under plasma concentration time curve (AUC) (117,4 ng-day/mL), volume of distribution (875,6 mL/kg), and clearance (187,1 mL/day). For IVM SC, the pharmacokinetic parameter values were as follows for healthy sheep: elimination half-life (10,2 days), TMR (12,38 days), AUC (211,34 ng-day/mL). Finally, for IVM IR, the following values of the pharmacokinetic parameters were found in healthy sheep: elimination half-life

(2,38 days), TMR (2,87 days), AUC (45,96 ng-day/mL). For the pharmacokinetic parameters studied, no statistically significant differences were observed when comparing the results obtained in the group of sheep treated with LPS with respect to those observed in the control group. Regarding plasma concentrations of IVM, no statistically significant differences were observed for the IV route when control sheep were compared with sheep treated with LPS. On the other hand, for the SC route, statistically significant differences were observed between both groups of sheep 24 hours after IVM administration, being lower in the group treated with LPS. IR administration of IVM in sheep treated with LPS produced a significant decrease in plasma concentrations of IVM compared to the control group 12 hours after drug administration. For both the SC route and the IR route, differences were observed in the absorption phase of the drug. Regarding the tissue distribution of IVM after SC administration, the highest concentrations in healthy sheep were observed in bile (165,8 ng/mL), liver (56,7 ng/g) and kidney (22,8 ng/g), no differences being observed with the sheep treated with LPS.

It is concluded that the RFA induced by the intravenous administration of LPS from *E. coli* in adult sheep did not produce changes in the pharmacokinetic parameters of IVM when it is administered by IV, SC and IR routes, nor in the tissue distribution of IVM when it was administered. It is administered SC, so its administration in therapeutic doses is safe in sheep with an inflammatory condition derived from an infectious process.

## I. INTRODUCCIÓN

El parasitismo gastrointestinal (pgi) es una de las principales causas de morbilidad en los animales. En rumiantes estas infecciones pueden disminuir la tasa de fertilidad y la tasa de crecimiento, disminuir la producción de carne y de leche e incluso producir la muerte en los animales más infestados. Con la excepción del desarrollo de una vacuna para la infección por *taenia* en cerdos y de la hidatidosis en ovinos, los fármacos antihelmínticos representan el mayor método terapéutico disponible para el control de los parásitos gastrointestinales.

Evidencias experimentales indican que la farmacocinética de las drogas varía durante la ocurrencia de un estado patológico o una infección que involucre un componente inflamatorio, condiciones en las cuales la capacidad del organismo de manejar los fármacos se ve disminuida. Lo anteriormente expuesto, se debe a la disminución en la expresión de diferentes proteínas con actividad enzimática y/o transportadora que están relacionadas con los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos.

El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, es un modelo ampliamente utilizado para inducir la reacción inflamatoria de fase aguda (RFA) en animales de experimentación. Este modelo se ha utilizado para comparar la farmacocinética de diferentes agentes quimioterapéuticos, con animales sanos. La RFA provoca la liberación de citocinas y otros mediadores de la inflamación, dentro de estas son especialmente importantes las IL-1, la IL-6 y el FNT- $\alpha$  las cuales generan una alteración en la transcripción génica, con una menor producción de ARNm y por consecuencia una menor síntesis de proteínas enzimáticas y transportadoras. Dentro de las proteínas con actividad transportadoras destaca la glicoproteína-P (gp-P), que es una proteína de transmembrana responsable del fenómeno de resistencia a múltiples drogas

(MDR) y cuya principal función es bombear los fármacos desde el interior de la célula al espacio extracelular. Esta proteína se ubica en la mayoría de los principales órganos encargados de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos.

La ivermectina (IVM) es un antiparasitario lipofílico, ampliamente usado en el tratamiento contra diversos nematodos y artrópodos que afectan a los animales domésticos. Presenta una alta afinidad estructural por la gp-P lo cual limita su ingreso al Sistema Nervioso Central (SNC) y contribuye también a la eliminación fecal del fármaco. La IVM es pobremente absorbida por vía oral, y se elimina casi completamente en forma inalterada a través de las heces, dado que no es metabolizada en un nivel significativo en el organismo animal.

En base a estos antecedentes se considera de interés conocer el efecto de la RFA inducida por LPS sobre la disposición plasmática y tisular de IVM en ovinos. Se propone que la reacción inflamatoria conocida como RFA inducida por la administración de LPS de *E. coli* en ovejas, produce cambios significativos en la disposición plasmática y en la distribución tisular de la IVM con respecto a los animales clínicamente sanos.

Desde el punto de vista teórico, se espera que la administración de LPS de *E. coli*, pueda producir un aumento en la distribución tisular de IVM hacia SNC, y de igual manera aumentar la biodisponibilidad de este fármaco posterior a la administración oral. Los resultados obtenidos de este estudio pueden proporcionar información sobre si existen requisitos adicionales para el ajuste en la dosis o en el tiempo de retiro, cuando IVM se administra en animales que cursan con un proceso inflamatorio, ya que, aunque IVM no es un fármaco antibacteriano, generalmente se aplica a todo el rebaño y en una dosis estándar para cada animal, existiendo altas probabilidades de ser aplicada a animales que estén cursando con un cuadro infeccioso asociado a una RFA. Por lo anteriormente mencionado, el desarrollo de la propuesta actual podría

proporcionar nueva información sobre la farmacocinética y distribución tisular, de un fármaco ampliamente usado en medicina veterinaria. La información generada por este estudio servirá para establecer estrategias farmacológicas dirigidas a optimizar el uso de este antiparasitario disponible en medicina veterinaria, lo que puede tener trascendencia para la salud y producción animal, y para la salud pública.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 1 PARASITISMO GASTROINTESTINAL

La salud de los animales es afectada por diversas patologías siendo una de la más frecuente el parasitismo gastrointestinal, el cual constituye una limitación importante para el desarrollo de la producción ganadera a nivel mundial (Lanusse, 1994; Charlier *et al.*, 2014). La mayoría de los rumiantes son infectados por una gran variedad de parásitos helmintos, los que tienen un impacto negativo sobre la ingesta de alimento, la tasa de crecimiento, el peso y composición de la canal, el crecimiento de la lana, la fertilidad y la producción de leche (Fitzpatrick, 2013). Esto es especialmente grave en animales jóvenes y en pleno desarrollo, donde se reduce la capacidad de absorber y utilizar los nutrientes de manera significativa (Randall and Gibbs, 1981; Rubilar *et al.*, 2000), así como también en animales adultos destinados a producción, donde hay un significativo descenso de esta, llevando a importantes pérdidas económicas (Lespine *et al.*, 2012).

Los mecanismos subyacentes para el impacto de los helmintos sobre la producción se pueden dividir en tres categorías principales: a) por daño tisular directo y disminución del funcionamiento de los órganos afectados, b) por la desviación de energía, proteínas y recursos del huésped para producción en la defensa y mecanismos inmunes, y finalmente c) por la reducción de la ingesta de alimentos (Charlier *et al.*, 2014). Dentro de las infecciones parasitarias, la mayoría son provocadas por especies que habitan el tubo gastrointestinal, las cuales pueden generar una disminución del apetito, acompañado de anomalías en la fisiología gastrointestinal, alteraciones en el metabolismo de proteínas, energía y minerales, así como cambios en el equilibrio hidroelectrolítico (Maichomo *et al.*, 2004).

## 1.1 Fisiopatología del PGI

La depresión en la ingesta voluntaria de alimento es la característica más importante de las infecciones gastrointestinales por nemátodos, siendo ampliamente reconocida como un factor preponderante en la patogénesis de la enfermedad (Fox, 1997) y vinculada a los cambios hormonales en el hospedador, lo cual parece ser el principal mecanismo del impacto subclínico sobre la producción (Charlier *et al.*, 2014). A pesar de que aún no se conocen completamente los mecanismos que la provocan, actualmente se ha propuesto que se debe a una disminución en la motilidad gástrica, a consecuencia del dolor, de la hipergastrinemia y del aumento del pepsinógeno sérico (Fox *et al.*, 2006).

Posterior a la infección con un nematodo abomasal, como *Haemonchus*, se produce un incremento en el pH, probablemente a consecuencia de una alteración de la permeabilidad del epitelio, generándose una modificación del potencial eléctrico a ambos lados de la pared digestiva, con un consecuente aumento de iones de bicarbonato lo que eleva el pH. Este cambio en la acidez abomasal interfiere con la transformación del pepsinógeno en pepsina, por lo que se altera la digestión de las proteínas y disminuyen sus niveles plasmáticos (Simpson *et al.*, 2009). Adicionalmente, el aumento de pH reduce la microbiota del hospedero, lo cual afecta su estado nutricional, ya que la microbiota es una fuente importante de nitrógeno (Simcock *et al.*, 1999). Los cambios inducidos en la composición del microbioma intestinal podrían explicar las necesidades nutricionales especiales que se presentan en estos estados patológicos, tales como los requerimientos de aminoácidos azufrados como la metionina (Li *et al.*, 2016).

Otro efecto asociado a la presencia de parásitos adultos en el abomaso es el aumento en los niveles séricos de gastrina, lo cual puede estar asociado a la mediación de la inflamación, ya que la hipergastrinemia se mantiene cuando se

restablecen los niveles normales del pH en el abomaso (Simpson *et al.*, 2009). Esta inflamación es generada por muchos tipos de parásitos y sus estadios larvarios, y se asocia con una pérdida endógena en la mucosa del tracto gastrointestinal, lo cual es parcialmente atribuible a un aumento del desprendimiento de células epiteliales y a un aumento en la secreción de mucoproteínas (Coop and Kyriazakis, 2001), evidencia indica una fuerte asociación entre estas reacciones inflamatorias en la mucosa y el rechazo a los parásitos (Colditz, 2003). Los cambios generados en la mucosa durante el estado inflamatorio incluyen mastocitosis, infiltración de eosinófilos, fuga de proteínas del plasma y producción de aminas biógenas (Colditz, 2003).

En cuanto a los parásitos intestinales, estos afectan adversamente la digestión y absorción de los nutrientes de la dieta, lo cual también afecta la capacidad del hospedero para generar una respuesta inmune, debido a la reducción en la absorción de nitrógeno no amoniacal (Houdijk *et al.*, 2012). Las larvas y estadios adultos de los nemátodos gastrointestinales son responsables del daño de las capas de células epiteliales y la salida de plasma y fluidos extracelulares (Ingale *et al.*, 2010). El costo nutricional se dirige hacia la mantención de la inmunidad, lo que involucra respuestas inflamatorias locales, secreciones epiteliales y de anticuerpos. Estas respuestas generan una mayor demanda de proteína para que estos procesos se realicen de manera óptima (Ingale *et al.*, 2010). En conjunto, la necesidad de reparar los tejidos dañados, mantener la homeostasis sanguínea, plasmática y montar una respuesta inmune, requieren de un aumento en la utilización de proteína del 40%, por lo que se reduce la cantidad de proteínas disponibles para el crecimiento tisular y otras funciones (Ingale *et al.*, 2010). Estas pérdidas pueden variar desde 20 a 125 g de proteína por día en ovinos infectados con *Trichostrongylus colubriformis*, y en el caso de *Haemonchus contortus*, pueden representar hasta el 10% del volumen circulante por día (Ingale *et al.*, 2010). En vista de estas pérdidas en la cantidad proteína, existe un costo incrementado en la síntesis proteica para mantener la

integridad y fisiología tisular, lo cual puede resultar en hasta un 50% de reducción en el crecimiento con el mismo consumo de alimento de un animal no infectado a causa de la pérdida de proteínas o bien, a la desviación del nitrógeno endógeno (Houdijk *et al.*, 2012). Por consiguiente, los animales deben equilibrar su inversión en las funciones básicas, incluyendo inmunidad, crecimiento, reproducción y mantenimiento somático a través del curso de su vida (Jolles *et al.*, 2015).

Experimentos han demostrado que las respuestas inmunes dependen de la disponibilidad de recursos del hospedador, pero varían entre individuos. Sin embargo, se tiene conocimiento de que los animales tienden a ser más susceptibles a las infecciones bajo restricciones nutricionales (Jolles *et al.*, 2015). Esta susceptibilidad a las infecciones se acrecienta por el efecto del parasitismo sobre la integridad del epitelio (Ingale *et al.*, 2010), los nemátodos gastrointestinales además perturban el nicho intestinal, generando un efecto sobre la microbiota del huésped. Dado, que la microbiota es muy influyente en la inmunorregulación, no es sorprendente que la inmunidad del huésped se vea influida como consecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales (Grencis, 2015). Evidencia indica que la Infección primaria de *Heligmosomoides polygyrus bakeri*, se asocia con cambios en la microbiota intestinal del íleon terminal, ciego y colon en el ratón, con un aumento significativo en la cantidad de *Lactobacillus* y *Enterobacterias* (Grencis, 2015). Adicionalmente, estudios demuestran que algunos helmintos son capaces de generar una disminución en la respuesta mediada por los linfocitos T helper 1 (Th1), debido a su alta actividad inmunomoduladora, la cual permite la inducción de respuestas mediada por linfocitos T helper 2 (Th2), esto aumenta la susceptibilidad a la infección por patógenos en los que la protección es mediada por respuestas de tipo Th1 (Moreau and Chauvin, 2010).

## **2. CONTROL DEL PARASITISMO GASTROINTESTINAL**

### **2.1 Uso de antihelmínticos**

Debido a que las infecciones parasitarias representan una de las mayores causas de enfermedad y pérdidas productivas para los sistemas ganaderos en el mundo, es justificadamente necesario el uso de antihelmínticos para su control (Vercruysse and Claerebout, 2001). Esta medida ha demostrado ser eficaz en el control de los parásitos, tanto en bovinos como en ovinos, ejerciendo un efecto positivo en el rendimiento productivo de los animales (Rubilar *et al.*, 2000).

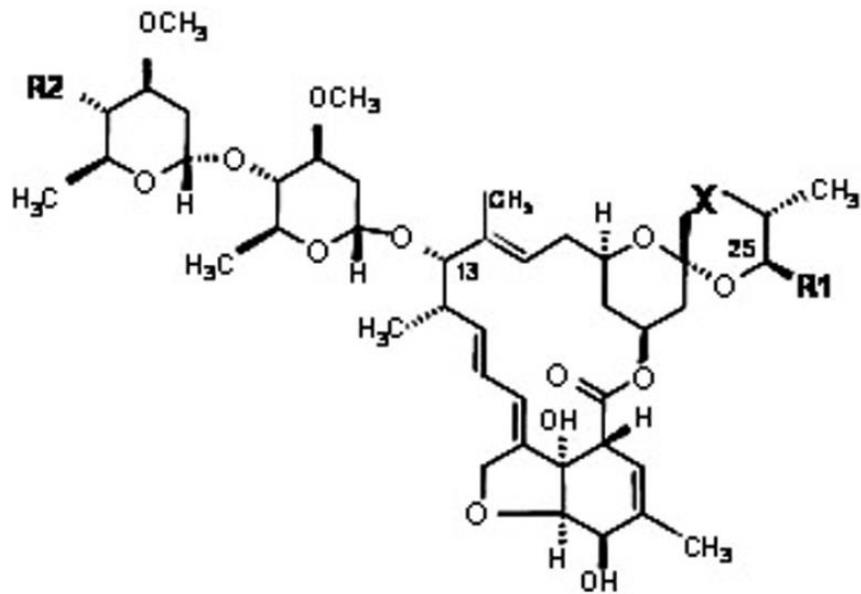
Los antihelmínticos se caracterizan en base a su estructura química, difiriendo cada clase de antihelmíntico, en su espectro de actividad contra los parásitos. A su vez la formulación de la droga determina la ruta de administración, lo cual influye en la biodisponibilidad y persistencia del fármaco en el cuerpo. Variaciones en la biodisponibilidad, el metabolismo y la tasa de eliminación, contribuyen a las diferencias de la eficacia clínica de un antiparasitario (Lanusse, 1994). Dentro de los antihelmínticos más usados se encuentran los pertenecientes al grupo de las lactonas macrocíclicas (Lespine *et al.*, 2012).

### **2.2 Lactonas macrocíclicas (LM)**

Las lactonas macrocíclicas (LM) son una gran familia de fármacos antiparasitarios de amplio espectro, ampliamente utilizados para el tratamiento de parásitos externos e internos de las diferentes especies de animales (denominados por esta razón endectocidas) (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010). Las LM son compuestos de alto peso molecular y elevada lipofilidad que se caracterizan por presentar un amplio volumen de distribución y prolongada persistencia de concentraciones efectivas en el organismo de los animales tratados con estos antihelmínticos. (McKellar and Gokbulut, 2012).

En este grupo se distinguen dos familias principales, las avermectinas y las milbemicinas, las cuales se diferencian por su estructura molecular y por sus propiedades físico-químicas (Hennessy and Alvinerie, 2002). La principal diferencia estructural entre milbemicinas y avermectinas es la sustitución del anillo macrólido de la avermectina con un grupo disacárido en el carbono 13 (Mc Kellar and Benchaoui, 1996). En cuanto a las propiedades fisicoquímicas, la milbemicina moxidectina se caracteriza por una amplia distribución en los tejidos y una notable persistencia en el organismo, mientras que las avermectinas muestran menores volúmenes de distribución y tiempos medios de residencia más cortos (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010).

El descubrimiento de las avermectinas en los años 70 provocó una revolución y un gran avance en el tratamiento y prevención de las enfermedades parasitarias, ya que debido a su gran potencia permitió reducir las dosis de antiparasitario de mg/kg de peso vivo a  $\mu\text{g/kg}$  de peso vivo (Mc Kellar y Benchaoui, 1996). La FIGURA 1 muestra la estructura del antiparasitario ivermectina.



**FIGURA 1:** Estructura química de ivermectina (Extraído de Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010).

La ivermectina (IVM), es un fármaco antiparasitario de alto peso molecular obtenido a partir de la fermentación del actinomiceto del suelo *Streptomyces avermectilis* (Campbell *et al.*, 1983), fue introducido comercialmente en 1981 y es el miembro más antiguo y de mayor uso del grupo de las avermectinas disponibles como producto comercial (Brownlee *et al.*, 1997). Está formado por la mezcla de dos compuestos homólogos 22,23-dihydroavamectina B1a (H2B1a, no menos de 80%) y 22,23-dihydroavamectina B1b (H2B1b, no más de 20%). El compuesto (H2B1a) es descrito como el marcador de residuos presente en la molécula de IVM para todos los tejidos y especies (Fisher and Mrozik, 1989). Este antihelmíntico se caracteriza por presentar un amplio espectro de actividad siendo efectivo frente a nematodos adultos y estados larvarios, así como a ectoparásitos de diferentes especies domesticas (Brownlee *et al.*, 1997).

Su mecanismo de acción se basa en la activación de los canales de cloruro dependientes de glutamato en las células nerviosas y musculares del parásito, inhibiendo la neurotransmisión al impedir el cierre de los mismos (Omura and Crump, 2004), esto incrementa la permeabilidad a los iones  $\text{Cl}^-$  en la membrana sináptica, los cuales hiperpolarizan la membrana neuronal impidiendo con ello la transmisión nerviosa, lo que conlleva a parálisis en la musculatura somática, particularmente la musculatura faríngea necesaria para la alimentación del parásito, conduciendo finalmente a su muerte (Omura and Crump, 2004). A bajas concentraciones, la IVM potencia los efectos del glutamato y en altas concentraciones abren canales de cloruro dependientes de glutamato directamente (Martín, 1997). Este antiparasitario también puede actuar sobre los canales de cloruro, dependientes de GABA. Sin embargo, para esto se necesitan concentraciones más elevadas de IVM (Omura and Crump, 2004).

El amplio margen de seguridad que se presenta en los vertebrados se cree está asociado con la falta de canales de cloruro asociados a receptores de glutamato y con la restricción relativa de los receptores asociados a GABA (McKellar and Gokbulut, 2012). Debido a que una de las grandes diferencias entre invertebrados y vertebrados, radica en que en los vertebrados las terminaciones nerviosas mediadas por el GABA se encuentran en el sistema nervioso central, en cambio, en los invertebrados las sinapsis mediadas por el GABA regulan la actividad muscular periférica, y dado que este fármaco no penetra la barrera hematoencefálica, se asegura su acción sobre el parásito y no sobre el huésped, a menos que se utilicen dosis inadecuadas (Campbell *et al.*, 1983). Sin embargo, efectos agudos de toxicidad por sobredosis en animales se atribuyen a neuro-intoxicación y se piensa que están asociados con la estimulación del receptor GABA (McKellar and Gokbulut, 2012).

Algunos animales (1 de cada 4 perros de raza Collie que poseen el fenotipo MDR1-/-) parecen ser particularmente sensibles a las LM y la

intoxicación en estos animales se asocia con altas concentraciones cerebrales las que fueron entre 2-31 veces las que se encuentran en el hígado y en el plasma (McKellar and Gokbulut, 2012), la mayor susceptibilidad de esta especie, se relaciona con una alteración en la expresión del gen MDR, el cual codifica para la proteína transportadora glicoproteína-P, la que está implicada en la protección del Sistema Nervioso Central a la entrada de ciertos fármacos (Geyer *et al.*, 2009).

Entre las propiedades fisicoquímicas de IVM destaca su alta lipofilicidad, ya que puede ser disuelta en la mayoría de los solventes orgánico. Sin embargo, es prácticamente insoluble en agua (0.0004% m/v) (Canga *et al.*, 2009). Debido a su naturaleza lipofílica, posterior a su administración IVM es extensamente distribuida con un amplio volumen de distribución (Vd) en todas las especies y tiende a acumularse en el tejido graso, que actúa como depósito del fármaco (McKellar and Gokbulut, 2012). La baja irrigación que presenta este tejido es la responsable de su lenta liberación desde la grasa y su larga persistencia de concentraciones sanguíneas efectivas, generando con ello un efecto antihelmíntico más prolongado (Atta and Abo-Shihada, 2000). Posterior a su administración, los mayores niveles de IVM se encuentran en el hígado y en la grasa, mientras que los niveles más bajos se encuentran en el cerebro (Canga *et al.*, 2009). Además, altas concentraciones de IVM se encuentran en el pulmón, el tracto gastrointestinal y la piel, tejidos donde se ubican preferentemente los parásitos (Lanusse, 1994; Lespine *et al.*, 2005).

La IVM es una molécula muy estable que experimenta poco metabolismo, por lo que la mayor parte de la dosis se excreta sin cambios (Canga *et al.*, 2009), la fracción de la dosis que es metabolizada (5 a 8%) se biotransforma principalmente en el hígado (Murphy *et al.*, 1995). Estudios metabólicos han demostrado que los principales metabolitos aislados *in vivo* en bovinos, ovejas y ratas son 24-OH-H2B1a y 24-OH-H2B1b. En ovinos y bovinos, se han

encontrado metabolitos menos polares en el tejido graso, lo que sugiere que en ambas especies los metabolitos hepáticos se esterifican con ácidos grasos y se almacenan en la grasa como entidades no polares (Canga *et al.*, 2009).

La IVM se elimina principalmente a través de las heces en todas las especies, independientemente de la vía de administración. La excreción fecal representa el 90% de la dosis administrada con <2% de la dosis excretada en la orina (Canga *et al.*, 2009). Las mayores concentraciones son excretadas por la bilis tanto de ovinos como bovinos logrando altas concentraciones en el contenido duodenal e ileal (Bogan and McKellar, 1988) y contribuyendo de esta forma a la alta excreción fecal (Laffont *et al.*, 2002).

### **2.3 Farmacocinética de IVM en ovinos**

La cinética de disposición de los endectocidas en general varía según la especie, la raza (McKellar and Gokbulut, 2012), la dieta, la gestión (estrategia basada en conocer el estado y relación de los componentes de la producción ovina para orientar las posibilidades de desarrollo), el estado nutricional (Ali *et al.*, 1996), el tipo de formulación del fármaco y la vía de administración (McKellar and Gokbulut, 2012). Las características farmacocinéticas de IVM luego de administrarse por vía intravenosa (IV) se han estudiado en vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos y perros, las que se muestran en la TABLA 1. Los volúmenes de distribución son sustancialmente más grandes (por lo menos el doble) en ovejas, cerdos y cabras que en perros y bovinos. Las diferencias en la cinética entre las especies reflejan las diferencias en la composición corporal (contenido de grasa relativa, la presencia o ausencia de reticulorumen), diferencias fisiológicas (gasto cardíaco y valores de pH de fluidos corporales) y también representan diferencias sustantivas en el metabolismo de IVM entre las diferentes especies (McKellar and Gokbulut, 2012). La vía de administración puede afectar sustancialmente la farmacocinética de IVM en ovinos (McKellar

and Gokbulut., 2012). Los niveles plasmáticos de IVM son menores en ovinos que en bovinos tal como se muestra en la TABLA 1. La biodisponibilidad subcutánea (SC) es altamente variable en esta especie, variando desde 22% (Lo *et al.*, 1985) a 98.2% (Canga *et al.*, 2009). Diversos estudios han demostrado que la inyección SC es la ruta de administración más eficiente en cuanto a la biodisponibilidad del fármaco en comparación con la vía tópica u oral (Lespine *et al.*, 2005; Gokbulut *et al.*, 2010), ya que confiere una mayor disponibilidad y podría esperarse mayor eficacia antiparasitaria (McKellar and Gokbulut, 2012), No obstante, evidencias actuales indican que posterior a la administración intraruminal (IR) de IVM, se observan concentraciones significativamente superiores tanto en el contenido como en la mucosa del abomaso y del intestino delgado en comparación a la IVM administrada por vía SC, esta información es relevante ya que estos sitios son los principales lugares de ubicación de los parásitos gastrointestinales (Lloberas *et al.*, 2013).

**TABLA 1:** Parámetros farmacocinéticos de IVM en diferentes especies animales tras la administración IV (Extraído y modificado de McKellar and Gokbulut, 2012).

Especie	Dosis (µg/kg)	Vd (L/kg)	ABC (ng.h/mL)	TMR (h)	Vida media (h)	Cl (L/kg.d)
Bovinos	200	2.2	6096	67	64	0.79
	300	1.9			67	
Caballos	200	3.7	8251	147	139	063
Ovinos	200	3.9	2695	30	32	1.97
	200	5.3	346	23	23	3.9
	200	4.7	396	25	22	3.54
Cabras	200	6.3	1461	45	65	3.39
Cerdos	300	7.9	2040	48	55	
Perros	200	2.4			43	

Vd: Volumen de distribución, ABC: Area bajo la curva, TMR: Tiempo medio de residencia, Cl: Clearance.

También se ha demostrado que IVM está altamente asociada con el material particulado ruminal y se sugiere que es parcialmente degradado en el retículo-rumen y fluidos abomasales (Prichard *et al.*, 1985), esto podría explicar los valores de concentración máxima (Cmax) y de área bajo la curva (ABC) inferiores obtenidos después de la administración por vía oral que los observados posterior a la administración SC (McKellar and Gokbulut., 2012). En ovejas, se ha demostrado que la biodisponibilidad sistémica después de la administración IR de IVM fue del 25% en comparación con casi el 100% después de la inyección intra-abomasal (Prichard, *et al.*, 1985).

La distribución de la IVM en los ovinos es más rápida y más amplia que en bovinos o caninos, esto debido a su deposición en el tejido adiposo, ya que el depósito de grasa es más grande en ovejas en comparación con estas especies, esto además contribuye a la presencia de concentraciones de antihelmíntico más bajas, aunque más persistentes en el tiempo (Atta y Abo-Shihada, 2000; Canga *et al.*, 2009).

#### **2.4 Efecto del parasitismo en la farmacocinética de IVM**

La farmacocinética de IVM puede ser afectada por diferentes factores, entre ellos destaca el efecto del parasitismo. Como se ha mencionado anteriormente el parasitismo es un problema importante en la salud de los rebaños, se ha observado que infecciones por nematodos gastrointestinales alteran considerablemente la disposición de IVM en el plasma tras la administración SC en corderos, por lo que los valores de ABC de corderos infectados fueron significativamente más bajos en comparación con animales libres de parásitos, esta diferencia se asoció con una vida media terminal más corta en los corderos infectados (Pérez *et al.*, 2006). La carga parasitaria gastrointestinal se asocia con graves cambios fisiopatológicos como la disfunción intestinal, mala condición corporal y bajo contenido graso, estos cambios

fisiopatológicos inducidos por el parasitismo sobre la mucosa gastrointestinal y los tejidos pueden alterar el paso gastrointestinal, el tiempo de digestión, la tasa de absorción del fármaco y la eliminación en comparación con los animales no parasitados (McKellar, 1993). Los parásitos a su vez pueden aumentar la susceptibilidad a la infección bacteriana, a través de la pérdida de la integridad epitelial, los cambios inducidos en microbiota normal del huésped y las alteraciones en la respuesta inmune (Moreau and Chauvin, 2010; Ingale *et al.*, 2010; Grecis, 2015). Esta infección bacteriana secundaria puede generar en el huésped la reacción sistémica denominada respuesta de fase aguda (Cray *et al.*, 2009). Se tiene conocimiento que esta respuesta puede alterar la farmacocinética normal de un determinado grupo de fármacos (Morgan *et al.*, 2008).

### **3. RESPUESTA DE FASE AGUDA INDUCIDA POR PATOGENOS**

La respuesta de fase aguda (RFA) es un conjunto de reacciones metabólicas y fisiológicas que forman parte del sistema de defensa temprana y/o sistema inmune innato del huésped (Peatman *et al.*, 2007), los cuales involucran barreras físicas y respuestas moleculares que sirven para prevenir la infección contra patógenos potenciales (Cray *et al.*, 2009). Este mecanismo puede ser activado por diferentes estímulos, entre los que destacan traumas, infecciones, estrés, inflamación o neoplasia (Kushner, 1982; Cray *et al.*, 2009), generando como resultado una reacción sistémica compleja, distante del sitio de la lesión, que involucran muchos órganos e incluyen un gran número de cambios fisiológicos, bioquímicos, nutricionales y de comportamiento (Ceciliani *et al.*, 2002; Peatman *et al.*, 2007).

Los fenómenos más evidentes de la RFA son fiebre, leucocitosis y la modificación cuantitativa y cualitativa de un grupo de proteínas no relacionadas estructuralmente que están presentes en la sangre y otros fluidos biológicos,

llamadas colectivamente proteínas de fase aguda (PFA) (Ceciliani *et al.*, 2002). Este es un proceso muy coordinado donde varios tipos de células y una red de proteínas inician, amplifican, mantienen el control y finalmente resuelven la reacción inflamatoria (Ceciliani *et al.*, 2002), teniendo como objetivos finales el controlar la infección, restablecer homeostasis y contribuir a la resolución del problema y al proceso de curación (Cray *et al.*, 2009). A menudo se conoce a la RFA como "termómetro molecular" ya que luego de su activación es posible proporcionar una evaluación de la respuesta inflamatoria al evento, a través de la cuantificación de los cambios bioquímicos y moleculares que se generan (Petersen *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2004; Cerón *et al.*, 2005). La RFA se inicia en un sitio inflamatorio local donde involucra básicamente tres procesos claves: cambios hemodinámicos, alteración de la permeabilidad vascular y modificaciones leucocitarias (Blatteis, 2006).

La etiología que desencadena esta reacción involucra dos estímulos principales: Estímulos externos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); y estímulos internos llamados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Brodsky and Medzhitov, 2009). Los PAMPs son estructuras microbianas reconocidas por la sangre y por proteínas de la célula, entre estas estructuras destacan las exotoxinas y las endotoxinas, las cuales son compartidas por varios tipos de patógenos, como bacterias Gram positivas y Gram negativas, algunos tipos de hongos y virus (Brodsky and Medzhitov, 2009); mientras que los DAMPs derivan de mitocondrias, núcleo, retículo endoplásmico u otro compartimento intracelular y se liberan después de una lesión o muerte celular, se consideran ejemplos de DAMPS a las proteínas de choque térmico, fragmentos de ácido hialurónico, moléculas de ATP, ácido úrico, sulfato de heparina, ADN, entre otros (Krysko *et al.*, 2011). Estos estímulos generan la activación de células inmunes que circulan en el torrente sanguíneo y como consecuencia, se produce la liberación de varias sustancias solubles, vasoactivas y quimiotácticas (sustancia P, bradiquinina, histamina y serotonina)

las que afectan la permeabilidad vascular y estimulan los receptores del dolor (Blatteis, 2006). Los aspectos inflamatorios posteriores son dependientes de citocinas y quimiocinas generadas por las células activadas (monocitos, macrófagos, fibroblastos, células del endotelio, plaquetas, queratinocitos, y células T) (Pandey and Agrawal, 2006).

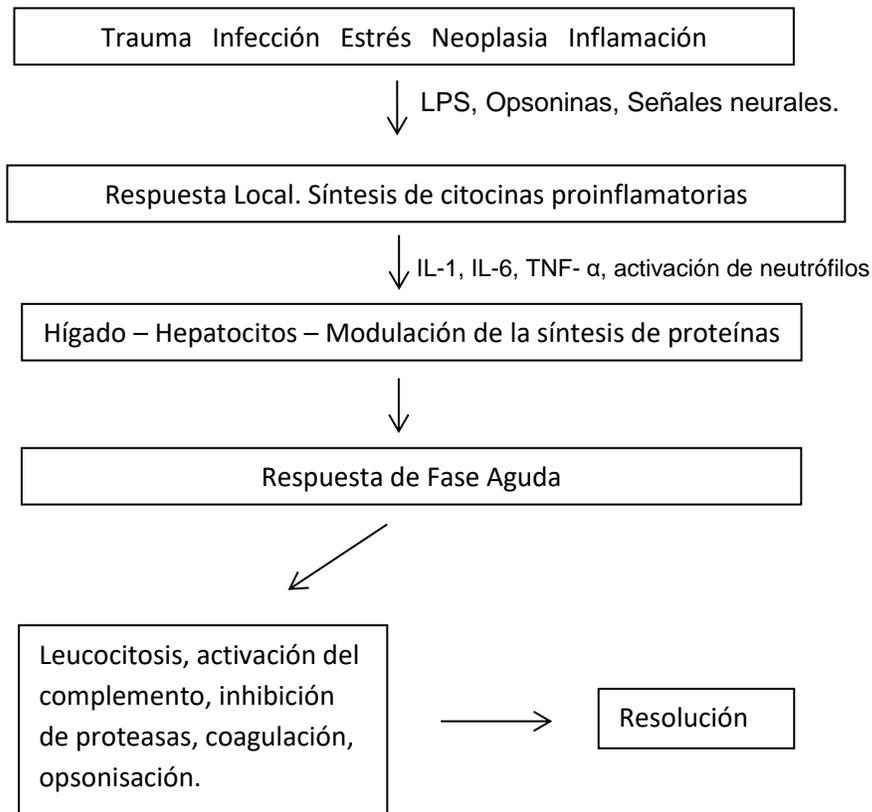
Las señales pro-inflamatorias incluyen la activación de los genes diana que codifican las citocinas pro-inflamatorias interleucina 1(IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (FNT-  $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) (Pandey and Agrawal, 2006), las que son consideradas como los principales entes estimuladores de la reacción sistémica a la inflamación (Ceciliani *et al.*, 2002). La liberación de estas citocinas además de activar la RFA, alteran rápidamente las tasas de síntesis de las PFA. El hígado es el principal sitio donde se realiza la síntesis de la mayoría de las proteínas por lo que comúnmente se le considera como el órgano central de esta respuesta (Peatman *et al.*, 2007). La FIGURA 2 resume los principales cambios fisiológicos que se generan durante la RFA.

La RFA puede dar lugar a cambios en más de 200 PFA, las cuales pueden aumentar o bien disminuir (Cray *et al.*, 2009).

Las PFA que aumentan, se clasifican dependiendo de la magnitud de su incremento en:

- Proteínas mayores: Aumentan de 10 a 100 veces su valor basal.
- Proteínas moderadas: Aumentan de 2 a 10 veces su valor basal.
- Proteínas menores: Solo presentan un ligero crecimiento.

Esta clasificación puede variar ligeramente según las diferentes publicaciones (Cray *et al.*, 2009)



**FIGURA 2:** Fisiología de los cambios celulares generados durante la RFA (Extraído de Cray *et al.*, 2009)

Las citocinas son sustancias de origen proteico (polipéptidos o glicoproteínas), de bajo peso molecular (Gomes *et al.*, 2016), que fluctúa entre 8 y 40000 Dalton (Blackwell, 2000), y que son secretadas por varias células del organismo, entre las que destacan los leucocitos (Gomes *et al.*, 2016). Su liberación ocurre como respuesta a múltiples estímulos (Gomes *et al.*, 2016) dentro de los cuales destaca el lipopolisacárido (Witkamp y Monshouwer, 2000). La función de estas moléculas consiste en mediar las interacciones entre las células del organismo afectado con el fin de establecer una respuesta inmune efectiva (Blatteis, 2006; Gomes *et al.*, 2016).

Las citocinas efectoras en términos prácticos se pueden dividir en citocinas pro-inflamatorias y en citocinas anti-inflamatorias (Witkamp y Monshouwer, 2000; Gomes et al., 2016). Las primeras estimulan el proceso inflamatorio mientras que las citocinas anti-inflamatorias derivadas de las células T, están involucradas en la regulación negativa de las reacciones de las enfermedades inflamatorias (Witkamp and Monshouwer, 2000). No obstante, esta clasificación no siempre es rígida (Witkamp and Monshouwer, 2000), ya que existen citocinas tales como, interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13) las que son potentes activadores de los linfocitos B, sin embargo, también son potentes agentes anti-inflamatorios por su capacidad para suprimir genes para citocinas pro-inflamatorias (Blackwell, 2000). Se cree que el resultado de una enfermedad, ya sea a corto o largo plazo, estaría determinado por la sumatoria de efectos de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatoria (Witkamp and Monshouwer, 2000).

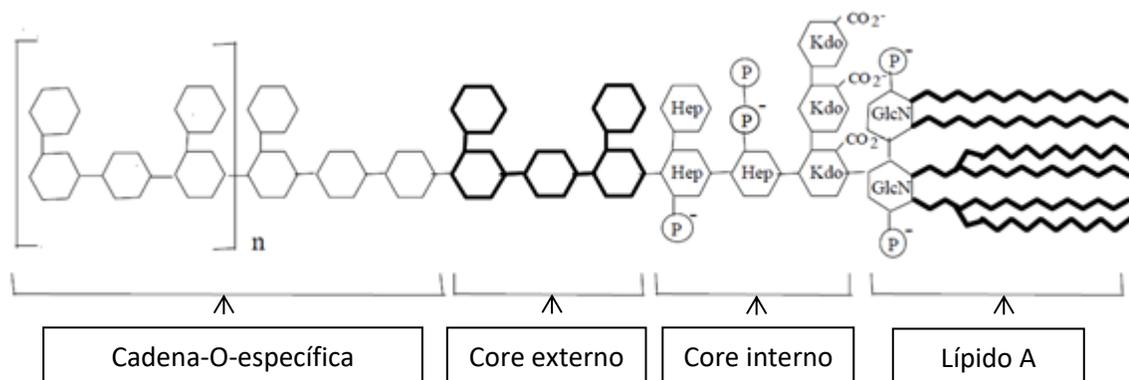
Las citocinas pro-inflamatorias son glicoproteínas que actúan a bajas concentraciones (Blatteis, 2006), se producen predominantemente por macrófagos activados, y están involucradas en la sobre-regulación de las reacciones inflamatorias (Witkamp and Monshouwer, 2000), mediando la comunicación celular en la respuesta inmune (Blatteis, 2006). Las citocinas con un efecto marcadamente pro-inflamatorio incluyen la IL-1, TNF-  $\alpha$ , IL-6 (Blatteis, 2006), interleucina 8 (IL-8), y la interleucina 17 (IL-17) (Gomes *et al.*, 2016). Estas citocinas actúan induciendo tanto efectos locales como sistémicos. El efecto local, radica en potenciar el proceso inflamatorio mediante la inducción de enzimas como la cicloxigenasa 2 (COX-2) y la óxido nítrico sintetasa (NOS). La enzima COX-2 transforma el ácido araquidónico en derivados eicosanoides como prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) y tromboxano (TXA<sub>2</sub>). Mientras que las NOS, produce liberación de óxido nítrico, el que genera un ambiente oxidativo en las células dañadas (Moses and Bertone, 2002). A nivel sistémico,

las características pleiotrópicas de las citocinas pro-inflamatorias permiten ejercer efectos biológicos en el sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso autónomo (SNA), sistema vascular, sistema endocrino, sistema inmune, hígado y médula ósea (Andus *et al.*, 1991). El aumento de la concentración de citocinas pro-inflamatorias en el torrente sanguíneo desencadena lo que se conoce como la RFA (Van Miert, 1995).

### **3.1 Rol del Lipopolisacárido (LPS) en la RFA**

El Lipopolisacárido (LPS) es una endotoxina que se encuentra unida a la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desempeñando una importante función en la activación del sistema inmune, ya que constituye el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias (Romero Hurtado and Iregui, 2010), contribuyendo además, en su protección contra la acción de los anticuerpos, el sistema del complemento, la fagocitosis por los macrófagos (Ward and Inzana, 1994), y contra agentes antimicrobianos (Rosenfeld and Shai, 2006). Estructuralmente el LPS es una molécula glicolipídica conformada por: el lípido A, el antígeno O, y núcleo o “core” (Raetz and Whitfield, 2002). El lípido A es un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos que por lo general son ácido caproíco, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico los cuales están insertos en la membrana externa de la bacteria (Romero Hurtado and Iregui, 2010). Este posee características estructurales únicas, difiriendo en detalles estructurales entre los diferentes tipos de bacterias (Beutler and Rietschel, 2003) y es responsable de las propiedades biológicas atribuidas a la endotoxina (Raetz and Whitfield, 2002; Romero Hurtado and Iregui, 2010). El antígeno O es un polímero de unidades repetidas que consta de 1 a 8 residuos glicosídicos altamente variable entre especies bacterianas (Romero Hurtado and Iregui, 2010), y es el que determina la especificidad serológica de las bacterias (Raetz and Whitfield, 2002). Finalmente, el núcleo o “core”; que corresponde a una cadena de

disacárido que une a las regiones mencionadas anteriormente (Raetz and Whitfield, 2002). La FIGURA 3 esquematiza la estructura del LPS.



**FIGURA 3:** Estructura del Lipopolisacárido (Extraído de Bermejo and Duarte., 2003)

Desde que Richard Pfeiffer proponen que las endotoxinas eran constituyentes de casi todos los grupos de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Beutler and Rietschel, 2003), estas se han convertido en el foco de una vasta investigación sobre los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la infección microbiana (Rietschel and Cavillon, 2002). Actualmente el LPS es considerado un potente estimulante inflamatorio y pirético, que genera e imita el proceso febril que sucedería en un estado inflamatorio *in-vivo* (Morgan et al., 2008), por lo que representa una herramienta adecuada para la comprensión de los fenómenos involucrados en la infección (Remick and Ward, 2005).

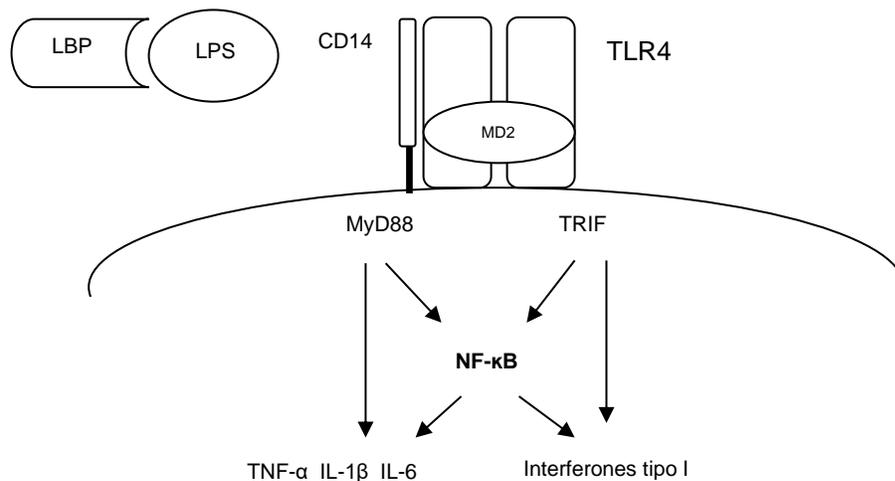
La endotoxina de *Escherichia coli* es una de las endotoxinas más ampliamente utilizada como un modelo alternativo a infecciones (Morgan *et al.*,

2008), aunque este modelo no es un sustituyente genérico de infecciones bacterianas y de respuestas inflamatorias agudas (Post *et al.*, 2003), es de fácil uso y relativamente semejantes a estos (Elmas *et al.*, 2008). En diferentes estudios su administración por vía IV, intraperitoneal (IP), SC e intramuscular (IM), se ha utilizado para inducir la producción de mediadores de la inflamación en varias especies, entre ellas caballos (Vendrig *et al.*, 2013), ovinos (Pérez *et al.*, 2015), conejos (Saitoh *et al.*, 2000; Elmas *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2016), cabras (Van Miert *et al.*, 1997) y cerdos (Myers *et al.*, 1999). Sin embargo, se presentan variaciones entre las especies a los efectos de la endotoxina (Post *et al.*, 2003).

### **3.2 Mecanismo de acción del LPS**

Posterior a la infección bacteriana, se produce la liberación del LPS desde su membrana celular, como consecuencia de la multiplicación o lisis bacteriana (Romero Hurtado and Iregui, 2010), quedando libre en la circulación y pudiendo interactuar con varias proteínas del huésped (Lu *et al.*, 2008). Análisis estructurales y bioquímicos han demostrado que estas proteínas incluyen varias moléculas, como la proteína ligante de LPS (LBP), la glicoproteína cluster de diferenciación 14 (CD14), la proteína adaptadora MD-2 y el receptor tipo toll 4 (TLR-4) (Lu *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2013). La LBP es una proteína sérica soluble (Lu *et al.*, 2008) originalmente aislada desde granulocitos de conejos (Weiss *et al.*, 1975), que se une directamente al LPS, formando el complejo LPS-LBP (Lu *et al.*, 2008). La formación de este complejo facilita la transferencia de moléculas de LPS a receptores proteicos con alta afinidad, pertenecientes al CD14 (Wright *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 2008; Romero Hurtado and Iregui, 2010). El CD14 es una glicoproteína que se encuentra en forma soluble (CD14s), o anclada a la superficie celular de monocitos, macrófagos, polimorfonucleares y células endoteliales (CD14m) y que no posee dominio intracitoplasmático (Romero Hurtado and Iregui, 2010), es definido como uno de los principales responsables

de la activación celular inducida por la endotoxina, aunque también se han postulado mecanismos de activación independientes de dicha molécula (Bermejo and Duarte, 2003). La principal función de esta glicoproteína es transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento formado por la molécula adaptadora MD-2 y el TLR-4 (TLR4/MD-2) (Heumann *et al.*, 1998; Ibrahim *et al.*, 2013). La MD-2 es una proteína soluble que se asocia covalentemente con el receptor TLR4 para llevar a cabo la transducción del LPS (Lu *et al.*, 2008), esta asociación se lleva a cabo sobre la superficie celular antes de que la unión del LPS tenga lugar (Ibrahim *et al.*, 2013). El TLR-4 es un homodimero glucoproteico que se expresa en la superficie celular de monocitos, macrófagos tisulares, células de Kúpffer, células dendríticas, células hematopoyéticas (Nagai *et al.*, 2006), y se une de manera específica al LPS, interviniendo en la respuesta a la endotoxina (Bermejo and Duarte, 2003).



**FIGURA 4:** Esquema general de la señalización LPS / TLR-4. El reconocimiento del LPS es facilitado por LBP y CD14, y está mediada por complejo receptor TLR-4/ MD-2 (Extraído y modificado de Lu *et al.*, 2008)

El reconocimiento del LPS, se produce mediante la unión al TLR-4, asociado de manera física a la molécula de superficie celular denominada MD-2 (Buer and Balling, 2003), lo que se indica en la FIGURA 4. Una vez se ha formado el complejo LPS-TLR4/MD-2, el TLR-4 sufre una oligomerización, lo que representa la primera reacción, que dará origen finalmente a la activación de vías intracelulares de transducción del LPS (Romero Hurtado and Iregui, 2010).

### **3.3 Vías de transducción del LPS**

Posterior a la oligomerización que sufre el TLR-4, se inicia una reacción que comienza con la interacción con proteínas celulares que poseen dominios TIR (Receptores Toll de Interleucina 1). El dominio TIR contienen tres regiones altamente conservadas, que median las interacciones proteína-proteína entre el TLR-4 y las proteínas celulares de transducción de señales del LPS (Lu *et al.*, 2008). Existen cinco proteínas celulares utilizadas por el TLR-4 que contienen dominios TIR: proteína de diferenciación mieloide (MyD88); proteína adaptadora del dominio TIR (TIRAP); proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón (TRIF); molécula adaptadora relacionada con el TRIF (TRAM) y proteína inhibidora de la señal del TRIF (SARM) (O'Neill and Bowie, 2007; Romero Hurtado and Iregui, 2010). La señal de transducción del LPS, a través del TLR-4 ha sido dividida en dos rutas, la vía dependiente de la proteína MyD88 y la vía dependiente de la proteína TRIF o también denominada vía independiente de la proteína MyD88 (Lu *et al.*, 2008; Romero Hurtado and Iregui, 2010; Van Lieshout *et al.*, 2015), cada una genera reacciones diferentes que concuerdan en un punto donde activan el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB). En condiciones normales (ausencia del LPS) este factor se encuentra en forma inactiva en el citoplasma unido al inhibidor del factor kappa B (iKb), pero tras la señal enviada por las proteínas MyD88 o TRIF se activan quinasas del iKb que lo separan del NF-kB activando este último (Romero Hurtado and Iregui, 2010), una vez activo se transloca al núcleo donde se une a la región promotora de los

genes de respuesta inflamatoria generando como consecuencia final la transcripción de interferones tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1a,  $\beta$ 1b) si fue activado por la vía del TRIF y de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  IL-6) si ocurrió por la vía de la proteína MyD88 (Lu *et al.*, 2008).

#### **4. CAMBIOS FISIOLÓGICOS DURANTE LA RFA**

##### **4.1 Cambios Neuroendocrinos**

Dentro de los cambios neuroendocrinos generados por la RFA destaca la fiebre, la cual es una reacción fisiológica compleja, que se define como la elevación de la temperatura corporal central por encima del rango normal de la especie (Dalal and Zhukovsky, 2006), y es considerada como una de entre las series de respuestas de defensa del huésped a la invasión corporal por patógenos microbianos tales como bacterias y virus (Blatteis, 2006). No obstante, este fenómeno también se puede deber a la exposición de alérgenos, enfermedades autoinmunes, neoplasias, desordenes granulomatosos, estrés y trombosis (Blatteis, 2003). La fiebre difiere de la hipertermia, ya que en la fiebre el aumento de la temperatura corporal (TC) es el resultado de la operación deliberada de efectores termogénicos activos, mientras que la hipertermia es la consecuencia inevitable de la ganancia pasiva de calor en exceso y de la incapacidad de efectores termolíticos activos para disipar este calor (Blatteis, 2006; Ogoina, 2011). Por lo tanto, la hipertermia es un evento patológico dependiente de la temperatura ambiente (TA), mientras que la fiebre es una respuesta fisiológica que se puede desarrollar a cualquier TA y puede ser un proceso benéfico para el organismo (Blatteis, 2006).

La fiebre es considerada el signo más manifiesto y familiar de la RFA; siendo denominada por ello, el sello de la infección (Blatteis, 2006). Las señales

febriles transportadas por pirógenos ya sea exógenos o endógenos, conducen a restablecer los circuitos de termorregulación por dos vías principales, la vía neural y la vía humoral (Ogoina, 2011). En la vía humoral las señales de la fiebre se realizan por componentes de productos microbianos, por pirógenos o por citocinas en circulación (Ogoina, 2011).

Posterior a la llegada de los PAMPs o DAMPs y su reconocimiento por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (RRP), se genera la liberación de citocinas pirogénicas pro-inflamatoria sintetizadas a partir de células fagocíticas activadas (Dinarello, 2004; Blatteis, 2006; Dalal and Zhukovsky, 2006), dentro de estas, tres citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), se consideran como los principales estimuladores de la reacción sistémica a la inflamación (Ceciliani *et al.*, 2002) y responsables del aumento de la temperatura corporal (Dalal and Zhukovsky, 2006).

Estas citocinas acceden a la circulación sanguínea general y son transportadas al área preóptica-anterior del hipotálamo (POA), que es el sitio cerebro controlador de termorregulación primaria; siendo el núcleo preóptico ventromedial (VMPO) el locus productor de la fiebre (Boulant, 2000). Las citocinas pueden pasar al POA a través de los órganos circumventriculares (órganos que presentan fenestraciones y carecen de una barrera hematoencefálica), en particular el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) que se encuentra en la línea media del POA (Blatteis, 2006). Se ha demostrado la existencia de receptores TLR-4 específicos para el reconocimiento de LPS en el endotelio de OVLT (Laflamme and Rivest, 2001).

En estas regiones las citocinas se unen a receptores expresados en estructuras vasculares, gliales y neuronales del cerebro. La activación de estos receptores centrales induce la activación de la COX-2 y estimula la síntesis de PGE<sub>2</sub>, promoviendo además la síntesis de más citocinas en el cerebro (Ogoina,

2011). Las citocinas circulantes que no pueden penetrar en el cerebro, pueden inducir a la generación de citocinas pirogénicas adicionales y/o PGE2 por las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, por la microglía perivasculares y macrófagos meníngeos (Blatteis, 2006).

La PGE2 es una pequeña molécula que difunde fácilmente través de la barrera hematoencefálica, y se une a receptores específicos de PGE2 (receptor EP3) en el POA (Turrin and Rivest, 2004). El aumento de PGE2 estimula la síntesis y liberación de AMPc y otros neurotransmisores, la síntesis de dichos mediadores activa a un grupo de neuronas termosensibles localizadas en el POA, resultando en un reajuste del termostato corporal, aumentando con ello la temperatura por sobre los rangos normales (Dinarello, 2004). Estas señales neurales son captadas en la corteza, por consiguiente, se inician cambios de comportamiento. Así mismo, las señales provenientes del centro termorregulador, mediante la vía simpática, activan nervios eferentes periféricos a los vasos sanguíneos. El efecto de este mecanismo es la vasoconstricción cutánea, resultando en la disminución de la pérdida de calor y aumento de la temperatura corporal (Dinarello, 2004). Aunque PGE2 sigue siendo fundamental en la respuesta febril, algunas citocinas y muchos otros mediadores de la inflamación pueden activar la respuesta febril independiente de PGE2 incluyendo, bradiquinina, óxido nítrico, IL-6 e IL-8 etc (Roth and De Souza, 2001).

En la vía neural las señales periféricas de fiebre pueden comunicarse con el SNC a través de los nervios periféricos como los nervios sensoriales cutáneos y el nervio vago, esta vía sería el mecanismo por el que puede iniciarse rápidamente la fiebre (Roth and De Souza, 2001; Blatteis, 2007). La formación localizada de PGE2 en sitios de inflamación contribuye a la generación fiebre por activación cutánea de los nervios sensibles al frío, los cuales a su vez transmiten señales de fiebre a las regiones del cerebro responsables de la generación de la fiebre (Rummel *et al.*, 2005). La transmisión de señales febriles a través del nervio

vago sigue una vía más compleja, acá los pirógenos circulantes, activan el complemento el que a su vez actúa estimulando a las células de Küpffer del hígado para producir mediadores endógenos incluyendo citocinas pirogénicas, las cuales activan la rama hepática del nervio vago que es la que transmite señales febriles a la zona de proyección central del nervio vago en el núcleo de tractus solitarius (NST). Desde el NST, la señal pasa a POA del hipotálamo, a través del haz noradrenérgico ventral, causando la liberación de norepinefrina intra-preóptica (Roth and De Souza, 2001; Blatteis, 2007).

El papel de los aferentes vagales en la generación de la fiebre se basó en estudios experimentales en ratas, donde se demostró que la vagotomía quirúrgica provoca la atenuación o aborto completo de las respuestas febriles a estímulos pirogénicos (Hopking, 2007). Paralelamente se activan mecanismos inhibidores del proceso febril mediante la liberación de citocinas anti-inflamatorias como la IL-4, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y antagonistas de receptores de citocinas como el antagonista de IL-1 (Dinarello, 1996). Adicional a la generación de fiebre, la estimulación del SNC por parte de las citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ /IL-6), resulta en la manifestación de una variedad de respuestas principalmente mediadas por la activación de los ejes hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) e hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG), induciendo cambios en el comportamiento tales como letargia, anorexia, adiposidad, desinterés por el medio y por la actividad sexual (Karrow, 2006).

#### **4.2 Cambios en la concentración de las proteínas de fase aguda (PFA)**

Uno de los fenómenos claves en la RFA frente a casos de inflamación e infección, son los cambios significativos que ocurren en las concentraciones de PFA (Petersen, 2004; Cray *et al.*, 2009). Si bien no está del todo entendido su rol, se sugiere que estas participarían en la restricción del crecimiento microbiano, el reconocimiento y eliminación de patógenos a través de la opsonización, la limitación del daño de los tejidos del huésped producidas por

enzimas proteolíticas y metabolitos de oxígeno, además de la disminución de la reacción inflamatoria (Ceciliani *et al.*, 2002), siendo las citocinas pro-inflamatorias los principales mediadores de la síntesis de las PFA en el hígado (Yoshioka *et al.*, 2002).

El aumento en la concentración de las PFA en circulación está relacionada a la severidad de los desórdenes y a la extensión del daño tisular en los animales afectados (Murata *et al.*, 2004). Los niveles de concentración plasmática aumentan o disminuyen al menos un 25% durante procesos de inflamación aguda, e incluso, en procesos inflamatorios crónicos. De acuerdo a la magnitud en las concentraciones, las PFA pueden clasificarse como positivas o negativas, no obstante, las variaciones de las concentraciones de proteínas pueden diferir significativamente entre las especies (Cray *et al.*, 2009).

En rumiantes, las PFA positivas que presentan un mayor aumento son el Amieloide serico A y la haptoglobina (Ceciliani *et al.*, 2002; Cray *et al.*, 2009). A la primera se le conocen al menos tres funciones importantes como son: unión de colesterol, actividad inmunomoduladora favoreciendo la quimiotaxis de polimorfonucleares y la opsonización de bacterias Gram positivas y Gram negativas, mientras que la función principal de la haptoglobina es la de unirse a la hemoglobina, cumpliendo de este modo un rol antioxidante al evitar el daño oxidativo celular, sin embargo, también se ha asociado con una función anti-inflamatoria y una mejora en la angiogénesis (Ceciliani *et al.*, 2002)

Se considera a las PFA como negativas cuando disminuyen su concentración (Heinrich *et al.*, 1990). Se ha documentado que, en todas las especies mamíferas durante la RFA, las concentraciones de albumina disminuyen entre un 10 a un 30 % (Gruys *et al.*, 2005). Esta baja se atribuye a una disminución en la síntesis de albúmina, la cual se debería al uso de los aminoácidos en otros procesos que incluyen, la generación de otras PFA, la

síntesis de importantes mediadores de la inflamación (Paltrinieri, 2008), o estar disponibles para la gluconeogénesis (Ceciliani *et al.*, 2002). Las PFA son una importante herramienta en el diagnóstico, pronóstico y monitorización de tratamientos de variadas condiciones patológicas que afectan a distintas especies (Martínez-Subiela *et al.*, 2001). Se ha propuesto, incluso que en el futuro las PFA sean incluidas como un parámetro de rutina en los perfiles bioquímicos que se realicen a los animales (Eckersall, 2004).

#### **4.3 Cambios hematológicos y en la bioquímica sanguínea**

Además de los eventos producidos como la fiebre y los cambios en las concentraciones de las PFA, durante la RFA también se producen importantes cambios hematológicos y en la bioquímica sanguínea. Los cambios en la serie blanca es un fenómeno secundario a la activación del eje hipotálamo – hipófisis – adrenal, producto de la estimulación por las citocinas pro-inflamatorias circulantes, produciéndose como consecuencia la síntesis de cortisol (Paltrinieri, 2008). Jacobsen *et al.*, (2005), evaluó la respuesta sistémica a la aplicación de diferentes dosis de LPS en vacas, y observo un periodo de leucopenia que duro alrededor de 8 horas, seguido por un aumento en el número de leucocitos luego de 12 horas de administrado el LPS (Jacobsen *et al.*, 2005). La respuesta celular temprana se atribuye principalmente a la infiltración y almacenamiento de las células de la línea blanca en órganos tales como el hígado y el bazo, generando en este último la esplenomegalia característica de la sepsis por microorganismos Gram negativos (Gridley *et al.*, 2007). El posterior aumento en el número de leucocitos se debería al efecto del cortisol sanguíneo, ya que, entre sus efectos en la modulación de la respuesta inflamatoria, se describe la inducción de un rápido incremento de los leucocitos circulantes, debido a la liberación de leucocitos desde el pool marginal del endotelio vascular (Paltrinieri, 2008). La liberación de corticosteroides en el organismo, además lleva al animal a producir un nivel más alto de citocinas quimioatrayentes como IL-1, TNF-  $\alpha$ , IL-6, las

cuales estimulan la salida de células inmaduras desde la medula ósea hacia la circulación (Altenburg *et al.*, 2002), También se describe un aumento en el número de plaquetas circulantes en la sangre, este aumento refleja primeramente la liberación desde el pool de almacenamiento y después refleja un aumento en la síntesis por parte de la medula ósea (Ebersole and Capelli, 2000).

La RFA se caracteriza además por un descenso en el conteo de glóbulos rojos en la sangre (Ebersole and Capelli, 2000). Sin embargo, Yates *et al.*, (2011) en ovinos tratados con LPS describe un incremento del volumen globular (VG), efecto que atribuyen a la contracción esplénica, la cual produce la liberación de eritrocitos hacia la circulación sanguínea. El descenso en los eritrocitos contribuye a una disminución del hierro disponible para los patógenos (Ebersole and Capelli, 2000). Jacobsen *et al.*, (2005) encontró que luego de la administración de distintas dosis de LPS en vacas, se producía un descenso tanto en el hierro como en el calcio sérico. El descenso en el hierro se produjo desde la administración del LPS y alcanzo su menor valor a las 24 horas post-tratamiento, luego aumentó su concentración hasta valores basales a las 48 horas (Jacobsen *et al.*, 2005). El calcio sérico tiene un comportamiento similar, sufriendo un fuerte descenso hasta las 24 horas de ser administrado el LPS, posterior al cual aumenta hasta alcanzar los valores basales a las 48 horas de iniciado el estudio. Esta disminución en los niveles de calcio sérico indicaría una perfusión renal disminuida, ya que posterior a la administración de LPS se produce una fase de descenso en el volumen de eyección, con una caída en el gasto cardiaco y un consumo de oxígeno disminuido (Bermejo and Duarte, 2003).

En vista de los datos aquí señalados, se puede concluir que la administración de LPS representa un modelo útil y valido, para evaluar in vivo las respuestas fisiológicas que ocurren a consecuencia de la infección por organismos Gram negativos, siendo esta respuesta similar a la que ocurre en los animales que están cursando con una RFA. Esto reafirma la utilidad de este

modelo para estudiar el efecto de la RFA sobre las características farmacocinéticas de los fármacos.

A pesar de estos antecedentes, existen pocos datos que describan la magnitud y la relación entre los parámetros inflamatorios después de la exposición a dosis repetidas de LPS de *Escherichia coli* con el objetivo de generar una RFA en ovinos. Conjuntamente, esta especie animal presenta una gran variabilidad en los valores de referencia para la hematología y bioquímica clínica en las distintas regiones del mundo (Braun *et al.*, 2010), por lo tanto, es necesario evaluar las respuestas hematológicas y bioquímicas en esta especie, ya sea en condiciones normales como en ovinos tratados con LPS.

## **5 RESPUESTA DE FASE AGUDA Y SU EFECTO SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE LOS FÁRMACOS**

Existen suficientes evidencias que indican que la farmacocinética de los fármacos varía durante la ocurrencia de un estado patológico o una infección que involucre un componente inflamatorio, por lo tanto, la capacidad de manejar dichas drogas se ve mermada (Renton, 2005), estos efectos resultan de la expresión alterada de ciertas enzimas de la familia citocromo P450 (CYP 450) y de proteínas transportadoras de fármacos, las que son reguladas negativamente durante la generación de mecanismos de defensa del huésped (Morgan *et al.*, 2008). Esta regulación ocurre a nivel de la transcripción génica con una disminución de la expresión y síntesis de proteínas con actividad enzimática y transportadora, alterándose con ello el metabolismo, la distribución y eliminación de ciertos fármacos (Renton, 2004). Un estímulo inflamatorio global como la endotoxina bacteriana (LPS), puede regular a la baja a la mayoría de las proteínas de la familia de CYP450s y proteínas transportadoras, sin embargo, la

especificidad de CYP450s y regulación transportadora depende del modelo de inflamación en estudio (Morgan *et al.*, 2008).

La TABLA 2 muestra algunos estudios donde se ha usado el LPS como un estimulante de la RFA, con el objetivo de determinar su efecto sobre la farmacocinética de diferentes fármacos. Estos estudios indican que a consecuencia de la RFA se alteran los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución metabolismo y excreción.

Las investigaciones mostraron un aumento en la vida media de eliminación, el tiempo medio de residencia y el ABC de los fármacos sustratos de la CYP-450, efecto que estaba acompañado por una disminución en la síntesis de sus principales metabolitos. El resultado era menor cuando los fármacos se administraban en conjunto con un agente antiinflamatorio. Con respecto a los fármacos sustratos de glicoproteína-P, se observó un aumento en la absorción del fármaco, así como también un aumento en la distribución del fármaco hacia determinados tejidos principalmente el SNC (Goralski *et al.*, 2003).

**TABLA 2:** Estudios en los que se ha usado el LPS con la finalidad de conocer el efecto de la RFA sobre la farmacocinética de los fármacos

Fármaco	Especie	Referencia
Ampicilina-Amoxicilina- Cloranfenicol- Trimetropins.	Terneros	Groothius <i>et al.</i> , 1980
Enrofloxacino	Cabras	Rao <i>et al.</i> , 2000
Digoxina	Ratas	Goralski <i>et al.</i> , 2003
Enrofloxacino	Cerdos	Post <i>et al.</i> , 2003
Enrofloxacino	Conejos	Elmas y Uney, 2006
Flinixin meglumine	Conejos	Elmas <i>et al.</i> , 2008
Digoxina	Ratas	Kato <i>et al.</i> , 2008
Florfenicol	Ovinos	Pérez <i>et al.</i> , 2015

### 5.1 Mecanismo de transporte de fármacos en biomembranas

Los transportadores son una serie de proteínas de transmembranas que tienen importancia en los procesos farmacocinéticos, cumpliendo un papel fundamental en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los xenobióticos a través de las barreras celulares, ya que son responsable de la secreción de sustancias desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular, limitando los procesos de absorción y de distribución (Mizuno *et al.*, 2003). Entre las moléculas con función transportadora se incluyen: glicoproteína-P de resistencia a múltiples drogas (MDR/gp-P), la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos (MRP1-3), proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP), los péptidos de transporte de aniones orgánicos (OATPs) y transportadores catiónicos orgánicos (OCTs) (Mizuno and Sugiyama, 2002).

Dentro de estos transportadores, tiene especial importancia la glicoproteína-P (gp-P), la cual es una fosfoglicoproteína de transmembrana de aproximadamente 1280 aminoácidos y con una masa molecular de 170 kDa (Fardel *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2004), perteneciente a la super-familia de las ATP binding cassette (ABC) (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010; Pluchino *et al.*, 2015). Fue identificada por primera vez en células de ovario de hámster, demostrándose posteriormente como un factor importante involucrado en los fenómenos de resistencia a múltiples drogas (MDR) en células tumorales de mamíferos (Juliano and Ling, 1976). Este transportador de membrana es codificado por una subfamilia de genes donde se reconocen los genes *mdr1a*, *mdr1b* y *mdr2* en roedores y MDR 1 y 2 en humanos (Fernández *et al.*, 2004), los genes *mdr1a* y *mdr1b* en roedores y MDR1 en humanos son los que codifican a proteínas que participan en el transporte de fármacos. Sin embargo, los genes *mdr2* en roedores y MDR2 en humanos no están asociados al transporte de fármacos, sino que codifican a una traslocasa de fosfatidilcolina localizada en la membrana de los canalículos biliares (Smit *et al.*, 1993; Lanusse *et al.*, 2005).

La gp-P juega un papel trascendental en el transporte de moléculas a través de las membranas celulares, actuando como una bomba de eflujo que transporta una amplia gama de compuestos desde dentro de la célula hacia el exterior utilizando energía desde la hidrólisis de ATP (Pluchino *et al.*, 2015). Esta proteína se expresa constitutivamente en linfocitos circulantes y órganos tales como: intestino, riñón, hígado, pulmones, cerebro, testículos y placenta entre otros (Lin and Yamazaki, 2003; Fernández *et al.*, 2004; Hennesey and Spiers, 2007; Pluchino *et al.*, 2015). En el intestino delgado y grueso se localiza en la membrana de los enterocitos a nivel del ribete en cepillo (Lanusse *et al.*, 2005). En la placenta, la gp-P ha demostrado tener un papel importante en la protección del feto de un número de diferentes moléculas incluyendo esteroides sintéticos, herbicidas agrícolas y pesticidas (Sun *et al.*, 2006). Una consecuencia de estos

numerosos roles es que gp-P puede afectar los parámetros farmacocinéticos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos y xenobioticos (Lin and Yamazaki, 2003), estas modificaciones en la farmacocinética de sustratos para la gp-P, documentadas en los animales *mdr (-/-)* (knockout), pueden ser reproducidas cuando un efectivo inhibidor de gp-P es co-administrado con un sustrato de dicho transportador (Schinkel, 1997; Geyer *et al.*, 2009).

## **5.2 Efecto de la RFA en la expresión de la gp-P**

Como se mencionó anteriormente, el LPS estimula monocitos y macrófagos para inducir la liberación de citocinas pro-inflamatorias (Mollen *et al.*, 2006), quimiocinas, y eicosanoides desde diferentes tipos de células en el cuerpo (Mollen *et al.*, 2006), estas citocinas son en última instancia responsables de modificar la expresión y función de estas proteínas, con función metabólica y transportadora (Aitken *et al.*, 2006). Aunque un gran número de citocinas son capaces de regular los genes de estas proteínas, el papel de la IL-6 es la que se ha puesto en relieve (Morgan *et al.*, 2008). No obstante, estudios en ratas, han demostrado que la liberación de TNF- $\alpha$  puede ser relevante. Este actuaría activando el receptor de TNF-1 $\alpha$ , lo cual a su vez estimula la liberación de endotelina 1, y la activación secuencial del receptor de endotelina-1B, la enzima oxido nitrico sintetasa (NOS), y la proteína quinasa C, causando con ello, una pérdida rápida y reversible de la función del transportador gp-P (Hartz *et al.*, 2006).

El Receptor de pregnano X (PXR), es un factor de transcripción nuclear activado por xenobióticos que se expresa en los tejidos de barrera y excretorios, incluidos intestino, hígado y riñón donde controla el metabolismo y transporte de eflujo de xenobióticos (Ott *et al.*, 2009), además de activar la expresión de un gran número de proteínas (Beigneux *et al.*, 2002). Varios laboratorios han señalado que este PXR, es afectado en los hepatocitos por LPS o citocinas pro-inflamatorias donde destaca IL-6 (Morgan *et al.*, 2008). Existe evidencia que el

tratamiento sistémico con LPS disminuye la expresión PXR, lo que sugiere la participación de este receptor en la reducción de expresión proteica y función hepática durante las respuestas inflamatorias (Beigneux *et al.*, 2002). Otros genes responsables de la expresión proteica pueden ser regulados por otro receptor nuclear, denominado receptor constitutivo androstano (CAR). Evidencias experimentales demuestran que, en ratones portadores de tumores, las respuestas de PXR y CAR en el hígado se reducen, lo que indica que se altera la acción de los receptores nucleares involucrados en la regulación de las vías de eliminación del fármaco, resultados que son consistentes con los observados en modelos inflamatorios agudos (Beigneux *et al.*, 2002; Teng and Piquette-Miller, 2005).

La reducción de transportadores hepático y defectos funcionales en la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR) se han observado en estados inflamatorios después del tratamiento con LPS (Wang *et al.*, 2005; Aitken *et al.*, 2006). Reducciones significativas en los niveles de ARNm de Mdr2, gen que codifica para la gp-P hepática, se han observado en ratones portadores de tumores (Morgan *et al.*, 2008). También se ha asociado la pérdida de la expresión de Mdr1a con la consecuente pérdida de la expresión de la proteína transportadora de fármacos dentro de la barrera sangre-cerebro (Goralski *et al.*, 2003), permitiendo que los fármacos que son normalmente transportados fuera del cerebro por gp-P puedan entrar y causar toxicidad en el SNC (Renton, 2005). Esta disminución de la expresión de gp-P ha sido observada después de la inflamación sistémica inducida por LPS donde se ha visto una reducción del ARNm del gen Mdr1a en el cerebro y en los niveles de proteína y función transportadora de gp-P (Wang *et al.*, 2005), esto fue demostrado luego de la administración intracerebroventricular (i.c.v), de LPS en ratas, donde se observó una rápida reducción de la expresión de ARNm del gen Mdr1a en cerebro, esta

reducción fue máxima tres horas después de administrada la endotoxina (Goralski *et al.*, 2003).

### **5.3 Rol de la gp-P en la farmacocinética de IVM**

Entre los agentes quimioterapéuticos, en los que se ha demostrado que la gp-P juega un papel importante en la disposición cinética, destaca el grupo de las LM, dentro de este grupo destaca la IVM siendo uno de los fármacos, que presenta mayor afinidad por este transportador (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010). Se han realizado estudios utilizando inhibidores de esta proteína para evaluar su efecto sobre la farmacocinética de este endectocida (McKellar and Gokbulut, 2012).

Estudios realizados en ovejas y en ratas utilizando verapamilo (inhibidor de la gp-P), en coadministración con IVM, han demostrado un aumento considerable en la disponibilidad plasmática (Molento *et al.*, 2004), así como un retraso en la eliminación de IVM (Alvinerie *et al.*, 1999). La co-administración de IVM con ketoconazol o itraconazol, como inhibidores selectivos de gp-P aumentaron las concentraciones plasmáticas de IVM en ovejas (Ballent *et al.*, 2007; Alvinerie *et al.*, 2008) y la concentración tisular en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal en ratas (Lifschitz *et al.*, 2006).

Además de ser afectado por fármacos inhibidores, la función de la gp-P también puede ser modulada por un proceso sistémico que involucre un componente inflamatorio, como el que ocurre durante una infección bacteriana (Morgan *et al.*, 2008). Esto se demostró en ratas, a las cuales se les administró LPS intracerebroventricular con la finalidad de generar inflamación en el SNC, generando una rápida reducción de la expresión de ARNm del gen Mdr1a (Goralski *et al.*, 2003). Con relación a esta pérdida en la expresión de Mdr1a, se observó un aumento de la acumulación a nivel cerebral, de digoxina cuando este fármaco se administra periféricamente, cabe destacar que digoxina se

caracteriza por ser un sustrato de la gp-P (Goralski *et al.*, 2003). Por lo tanto, es importante evaluar el efecto de la aplicación de IVM a animales que presenten este tipo de respuesta, ya que no existen estudios donde se evalué el efecto de la respuesta inflamatoria sistémica sobre la disposición plasmática y distribución tisular de IVM. Es especialmente interesante evaluar su penetración al SNC, ya que el sistema de transporte de gp-P es responsable de evitar el ingreso de las LM al SNC, por lo tanto, en animales que cursen con un proceso agudo se podría esperar un aumento en las concentraciones cerebrales de este fármaco. Existen evidencias en animales como lo perros de raza collie, viejo pastor inglés o Border Collie, que presentan una delección en 4 pares de base del gen MDR 1 que codifica para una gp-p no funcional, los cuales presentan una especial sensibilidad a este fármaco, observándose efectos secundarios graves de neurotoxicidad, como depresión, midriasis, temores, somnolencia, salivación estado comatoso y muerte, posterior a la administración de IVM a las dosis de campo (Geyer *et al.*, 2009).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El parasitismo gastrointestinal representa uno de los principales problemas que afectan la producción animal generando importantes pérdidas económicas, por el efecto directo de los diferentes estados del parásito sobre la producción y la salud animal, dentro de estos efectos, destaca la alteración en el sistema inmune del huésped. Estos efectos se deben principalmente al efecto mecánico de los parásitos, principalmente estadios larvarios, sobre la mucosa y el epitelio gastrointestinal, lo que, sumado a la alteración de la flora normal presente en el aparato digestivo, predispone a la co-infección secundaria de otros microorganismos tales como bacterias. Cabe destacar que algunos parásitos tienen efecto inmunomodulador, lo cual, asociado a las alteraciones nutricionales generadas por estos, aumentan aún más la susceptibilidad a la infección bacteriana secundaria.

Para tratar este problema, a fin de disminuir las pérdidas generadas por el parasitismo, existe una amplia variedad de antihelmínticos destacando entre ellos el grupo de las LM, particularmente la IVM. Aunque IVM no es un fármaco antibacteriano, generalmente se aplica a gran parte del rebaño y en una dosis estándar para cada animal, existiendo altas probabilidades de ser aplicada a animales que estén cursando con un cuadro infeccioso que involucre un componente inflamatorio.

El conocimiento actual sobre la farmacocinética indica que esta se puede alterar en animales que estén cursando con un proceso infeccioso, esto es debido a los cambios fisiopatológicos generados por la respuesta inflamatoria aguda del huésped, además del efecto sobre la expresión de proteínas con función enzimática o transportadora de fármacos, que pueden alterar los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución, metabolismo y excreción,

aumentando el riesgo de toxicidad. Por lo tanto, es necesario saber ¿Cuál es el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el LPS de E. coli sobre la farmacocinética y la distribución tisular de IVM, cuando se administra por diferentes vías en ovinos?

Por lo anteriormente mencionado, el desarrollo de la propuesta actual podría proporcionar nueva información sobre la farmacocinética y distribución tisular, de un fármaco ampliamente usado en medicina veterinaria bajo condiciones de campo. La información generada servirá para establecer si existen variaciones en las concentraciones sanguíneas y tisulares de IVM en condiciones de un estado inflamatorio agudo, con el fin de evaluar los posibles cambios posológicos y establecer los periodos de espera en la eventualidad que se observen variaciones en las concentraciones en los tejidos. Por lo tanto, los resultados pueden tener trascendencia para la salud y producción animal, y la salud pública.

## **HIPÓTESIS:**

- La respuesta inflamatoria aguda inducida por la administración de lipopolisacárido de *Echerichia Coli* en ovinos modifica la disposición plasmática y la distribución tisular de Ivermectina en comparación con los efectos observados en animales control tratados con suero salino.

## **OBJETIVOS GENERALES:**

- Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por la administración de lipopolisacárido de *E. coli* en ovinos sobre la disposición plasmática y distribución tisular de Ivermectina.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- Determinar el efecto de la administración de dosis repetidas de 1 µg/kg por vía intravenosa de lipopolisacárido de *E. coli* sobre las variables fisiológicas, hematológicas y bioquímicas en ovinos.
- Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de Ivermectina administrada por vía intravenosa en ovinos.
- Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la farmacocinética plasmática y la distribución tisular de Ivermectina administrada por vía subcutánea en ovinos.

- Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la farmacocinética plasmática de Ivermectina administrada por vía intraruminal en ovinos.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODO**

### **Lugar de trabajo**

La fase experimental se desarrolló en las dependencias del Hospital Clínico Veterinario de animales mayores de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Campus Chillán. El procesamiento y análisis de las muestras para la determinación de las concentraciones plasmáticas y tisulares de IVM se realizó en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria del Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Concepción; Campus Chillán.

Previo a la fase experimental a los animales se les extrajeron muestras de sangre para análisis de hemograma y determinación de perfil bioquímico lo que se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Ciencias Clínicas.

Se utilizaron para este estudio ovinos adultos de raza Suffolk-Down con un peso promedio de entre 30 y 60 kg, los cuales fueron asignados mediante un diseño de bloques al azar a los diferentes grupos experimentales. Posterior a su llegada, se les realizó un examen clínico completo para establecer su condición de clínicamente sanos. El examen clínico consto de la evaluación de constantes fisiológicas y exámenes complementarios, obteniéndose muestras de sangre para evaluar hemograma y perfil bioquímico. Además, se realizaron exámenes fecales para determinar la condición parasitológica de los animales, por medio del recuento de huevos en materia fecal tanto de nematodos gastrointestinales, coccidias y trematodos. Los animales con resultado positivo a la presencia de nematodos gastrointestinales (ngi) se trataron con febendazol (Panacur® 10%, Intervet, Santiago, Chile) con un periodo de resguardo de 12 días; en tanto aquellos con recuentos positivos a coccidias fueron tratados con sulfa-trimetropin

(Azovetril®, VeterQuímica, Santiago, Chile) en la dosis recomendada para la especie. Los animales que no respondieron a los tratamientos antiparasitarios administrados y que presentaron recuentos positivos a ngi, así como aquellos cuyos parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos se encontraron fuera del rango normal para la especie fueron considerados como no aptos y se descartaron del estudio.

Con el fin de reducir el riesgo de ingestión de estadios infectantes de parásitos, los ovinos se mantuvieron estabulados. La nutrición se basó en heno de alfalfa de tercer corte (*Medicago sativa*), además de avena en grano (*Avena sativa*) que completan los requerimientos nutricionales de ovinos adultos. El agua fue suministrada *ad libitum*. Los corrales se encontraron bajo techo protegidos de los factores climáticos y en condiciones de ventilación apropiadas. La cama fue remplazada conforme a las necesidades de mantención del aseo y salud de los animales.

El modelo animal usado en este estudio es el ovino. La elección de esta especie radicó en que son animales fácilmente manejables y poseen un menor valor comercial y de mantención que animales de características semejantes, como es el caso del bovino.

### **Condiciones Generales**

El tamaño muestral de los grupos experimentales fue determinado según la fórmula descrita por Eng (2003) para estudios de investigación comparativa:

$$N = 4\sigma^2 (Z_{crit} + Z_{pwr})/D^2$$

Donde N = es el tamaño total de la muestra (la suma del tamaño de la muestra de todos los grupos experimentales).

$\sigma$  = es la desviación estándar de la ABC<sub>0-t</sub> para IVM obtenida para ovinos según Pérez et al. (2006).

Z<sub>crit</sub> = es el valor crítico de tabla para el criterio de significancia deseada.

Z<sub>pwr</sub> = es el valor de tabla para la potencia estadística deseada.

D = es la mínima diferencia esperada entre dos medias.

Para el cálculo se usarán una significancia de 0.05 y un poder de prueba de 0.8.

### **Diseño experimental**

**Objetivo 1: Determinar el efecto de la administración de una dosis de 1 µg/kg lipopolisacárido de *E. coli* sobre las variables hematológicas, fisiológicas y bioquímicas en ovinos.**

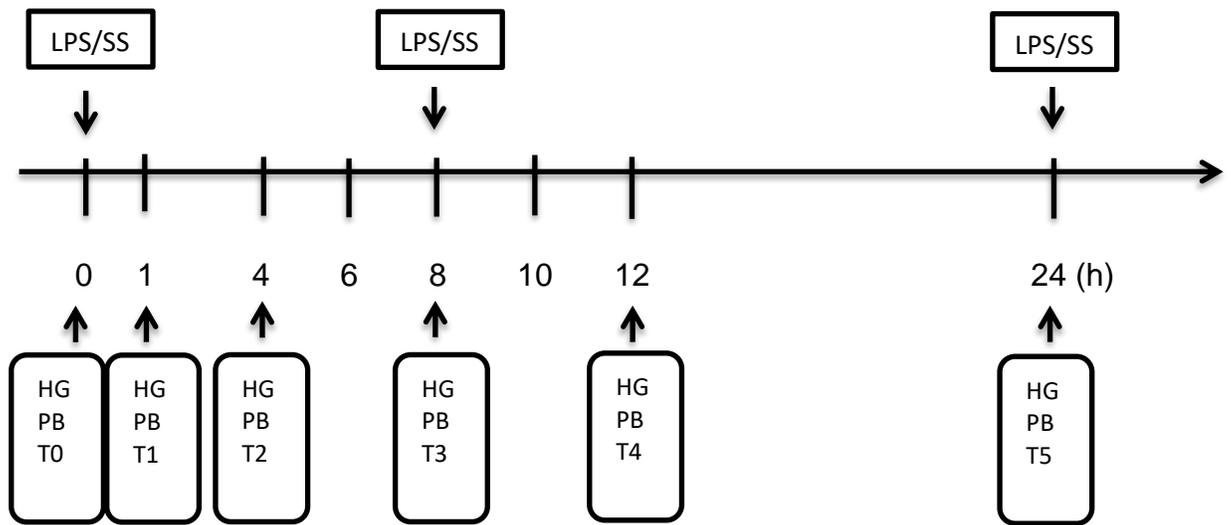
Evidencias experimentales indican que las endotoxinas bacterianas, son un factor importante en la fisiopatología de la sepsis generada por microorganismos Gram negativos (Ramachandran, 2014). Dentro de este grupo, destaca el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, el cual ha sido ampliamente usado como un modelo alternativo a infecciones, debido a su potente capacidad pirética e inmuno-estimulante en los animales (Morgan *et al.*, 2008). A pesar de que existe conocimiento que esta endotoxina genera signos clínicos evidentes y característicos de este fenómeno (Plessers *et al.*, 2015), hay pocos antecedentes que describan la magnitud y la relación entre los parámetros inflamatorios después de la exposición a dosis bajas de LPS de *Escherichia coli* en ovinos. Por ello es importante evaluar la respuesta clínica y hematológica que presentan estos animales, al ser sometidos a la exposición intravenosa de una dosis baja de LPS. La finalidad es desarrollar un modelo reproducible, que sea útil para estudiar el efecto de la infección y la inflamación generadas por productos bacterianos sobre las características farmacocinéticas de fármacos de uso veterinario, como es el caso de IVM.

Para cumplir este objetivo se desarrolló el experimento 1.

**Experimento 1.** Se seleccionó para el estudio un grupo de 10 ovinos Suffolk Down clínicamente sanos de 12 meses de edad y 40-50 kg de peso corporal (pc) con una condición corporal de 4/5 puntos en promedio. Los animales se dividieron en dos grupos de 5 animales cada uno, mediante un diseño de bloques al azar, considerando las variables raza, sexo, edad y peso corporal. El grupo experimental fue tratado con tres dosis intravenosas de 1 µg/kg de peso corporal de LPS a través de la vena yugular derecha a las 0, 8 y 24 horas (h) después de iniciar el estudio para inducir una RFA. El grupo de control se trató con el mismo volumen de SS a intervalos similares a los del grupo LPS.

Durante el período de prueba (0 a 36 horas), la frecuencia cardíaca (latidos / min), la frecuencia respiratoria (ciclos / min) y la temperatura rectal (° C) se registraron cada 15 minutos utilizando un monitor multiparámetro (Mek's, MP 800, Kangwon-do, nuevo líder mundial, Corea). Un aumento de 0,8 °C por encima de la temperatura rectal basal de la oveja se consideró como indicador de fiebre. Además, la temperatura ambiente se midió con un termómetro de temperatura máxima y mínima.

Se obtuvieron muestras de sangre (3 mL) por punción yugular antes, durante 1, 4, 8, 12 y 24 h y después de la primera administración de LPS o SS. La sangre se recogió en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para el análisis de hemograma y en un tubo sin anticoagulante para el análisis de perfil bioquímico. Los animales se inspeccionaron visualmente para detectar cualquier efecto adverso durante cada tiempo de muestreo por un período de 36 h. (FIGURA 5).



**FIGURA 5:** Esquema de extracción de muestras sanguíneas. HG: Hemograma, PB: Perfil bioquímico.

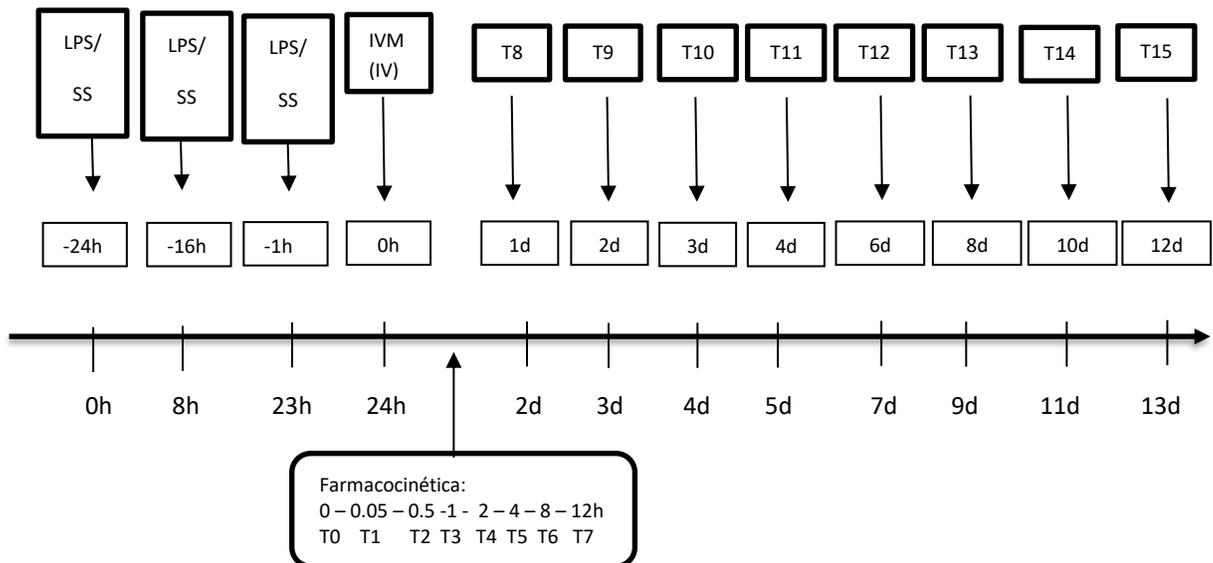
**Objetivo 2: Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de Ivermectina administrada por vía intravenosa (IV) en ovinos.**

La inflamación aguda regula la expresión, actividad y funcionalidad de muchas proteínas con función enzimática y transportadora de fármacos, las que son reguladas a nivel de la transcripción de los genes resultando en una disminución del ARNm y consecuentemente una disminución en su actividad (Morgan *et al.*, 2008). Dentro de las proteínas transportadoras destaca la gp-P, la cual tiene un importante rol en la fase de absorción, distribución y eliminación de diversos fármacos en el organismo, debido a su expresión en sitios como intestino, hígado, riñón, entre otros (Lanusse *et al.*, 2005). Las LM son importantes sustratos de esta proteína, destacando la IVM dentro del grupo (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010). La fuerte potencia de IVM para inhibir la gp-P se encuentra en el mismo rango que la de ligandos de gp-P informados hasta la fecha, tales como la ciclosporina A, su derivado PSC833 o loperamida (Lespine *et al.*, 2012).

Por lo tanto, es de interés determinar qué sucederá con la disposición plasmática de IVM administrada por vía IV, en animales que estén cursando con una RFA inducida por LPS de *E. coli* y si se presentaran cambios en estos parámetros al compararlos con ovinos sanos.

Para ello se desarrolló el experimento 2.

**Experimento 2.** Se seleccionó para el estudio un grupo de 10 ovinos Suffolk Down clínicamente sanos de 14 meses de edad y  $55 \pm 3,3$  kg de peso corporal, con una condición corporal de 4/5 puntos. Los animales se dividieron en dos grupos de 5 animales cada uno, mediante un diseño de bloques al azar, considerando las variables raza, sexo, edad y peso corporal. El grupo I fue tratado con tres dosis endovenosas (a las 0, 8 y 23 horas después del inicio del estudio) de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS de *E. coli* disuelto en solución salina al 0,9% libre de pirógenos. El grupo II, fue tratado con igual volumen de solución salina 0.9%(SS) y corresponde al grupo control. Veinticuatro horas después de la primera inyección de LPS o SS ambos grupos se trataron con 0.2 mg/kg de IVM (Ivomec® solución inyectable 1%, Merial®, Haarlem, Holanda) vía IV a través de la vena yugular. Se colectaron muestras de sangre (5 ml) desde la vena yugular contralateral a la que se inyectó el fármaco a las 0.05, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 192, 240, 288 horas post tratamiento con IVM, (FIGURA 6). Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos al vacío (SST™II Advance, BD Vacutainer®, Santiago, Chile) y luego centrifugadas a 3200 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada MIKRO22R (Hettich®, Alemania). El plasma obtenido se almacenó a -20°C hasta su análisis.



**FIGURA 6:** Esquema experimental para la extracción de muestras luego de la administración de IVM por vía intravenosa en ovinos.

**Objetivo 3: Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la farmacocinética plasmática y la distribución tisular de Ivermectina administrada por vía subcutánea (SC) en ovinos.**

La vía SC es una de las vías disponible para la aplicación de IVM en ovinos, por lo que es ampliamente usada en condiciones de campo (McKellar and Gokbulut, 2012), por lo anterior es de interés saber si la RFA generada por la administración de dosis repetidas de LPS puede generar cambio en la absorción, en la disposición plasmática y distribución tisular de IVM administrada por esta vía.

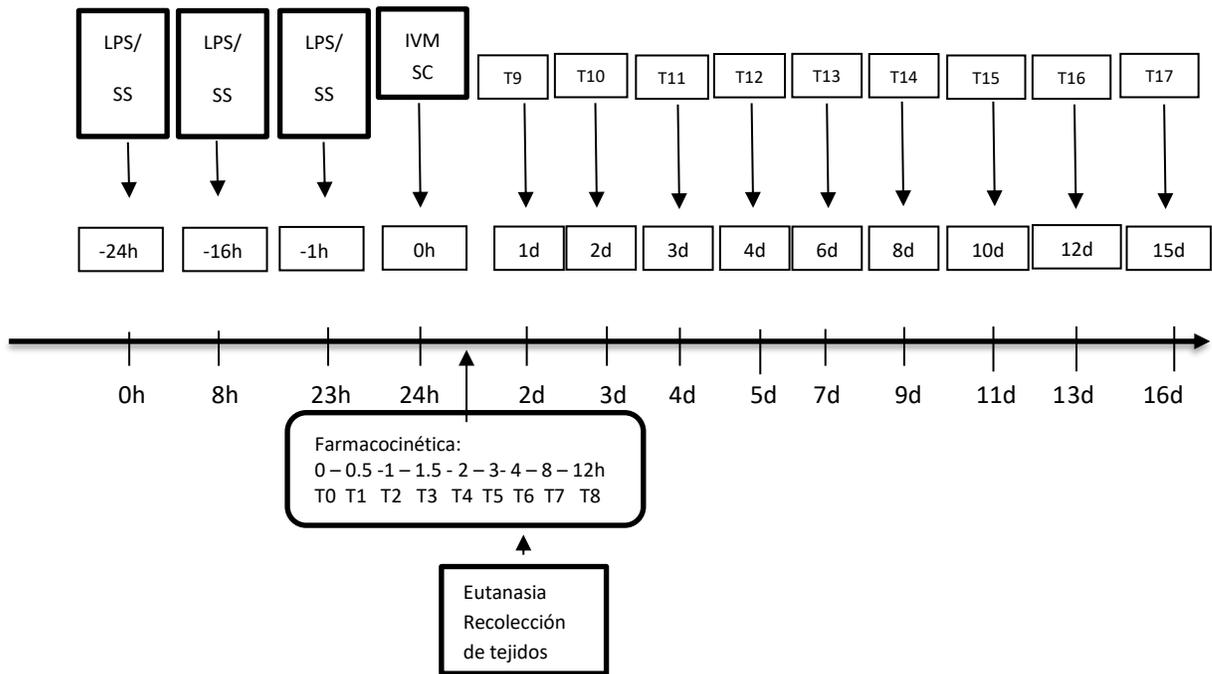
Para cumplir este objetivo se desarrolló el experimento 3.

**Experimento 3.** Se utilizaron para este estudio 22 ovinos de raza Suffolk Down, hembras y machos castrados clínicamente sanos. Se realizaron dos estudios diferentes, el primero se usó para estudiar la farmacocinética plasmática mientras

que el segundo se utilizó para determinar la distribución tisular del fármaco. Para determinar la farmacocinética plasmática se usaron 10 ovinos de raza Suffolk Down hembras y machos castrados clínicamente sanos, de 10 meses de edad y de  $36,3 \pm 2,8$  kg de peso corporal, estos fueron separados en 2 grupos experimentales de 5 animales cada uno, mediante un diseño de bloques al azar, considerando las variables raza, sexo, edad y peso corporal. El grupo I fue tratado con tres dosis endovenosas (a las 0, 8 y 23 horas después del inicio del estudio) de  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS de *E. coli* disuelto en solución salina al 0.9% libre de pirógenos. El grupo II, se trató con igual volumen de solución salina 0.9% (SS) y corresponde al grupo control. Veinticuatro horas después de la primera inyección de LPS ambos grupos recibieron  $0.2 \text{ mg}/\text{kg}$  de IVM (Ivomec® solución inyectable 1%, Merial®, Haarlem, Holanda) por vía subcutánea. Se colectaron muestras de sangre (5 mL) desde la vena yugular, previo y a las 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8, 12, 24 horas, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 días post tratamiento con IVM, (FIGURA 7). Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos al vacío (SST™II Advance, BD Vacutainer®, Santiago, Chile) y luego se centrifugaron a 3200 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrifuga refrigerada MIKRO22R (Hettich®, Alemania). El plasma obtenido se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Para el estudio de la distribución tisular de IVM se usó un grupo de 12 ovinos clínicamente sanos de 20 meses de edad y de  $58 \pm 8,7$  kg de peso corporal, con una condición corporal de 4/5 puntos. Los animales fueron separados en 2 grupos experimentales de 6 animales cada uno, mediante un diseño de bloques al azar, considerando las variables raza, sexo, edad y peso corporal. El grupo I fue tratado con tres dosis endovenosas (a las 0, 8 y 23 horas después del inicio del estudio) de  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS de *E. coli* disuelto en solución salina al 0,9% libre de pirógenos. El grupo II, se trató con igual volumen de solución salina 0.9% (SS) y corresponde al grupo control. Veinticuatro horas después de la primera inyección de LPS ambos grupos recibieron  $0.2 \text{ mg}/\text{kg}$  de IVM (Ivomec® solución inyectable 1%, Merial®, Haarlem, Holanda) por vía

subcutánea. A las 48 h de la administración de IVM, los animales fueron sacrificados de acuerdo con las recomendaciones de las Directrices de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) para la eutanasia en animales (Underwood et al., 2013). Las ovejas de cada grupo se sedaron con 1 mg/kg de xilacina y (XILAGESIC®, Xilacina Clorhidrato 2.33%, DragPharma Chile Invetec SA, Chile) y luego se sacrificaron con una inyección intravenosa de una solución de eutanasia (T-61, Intervet Chile, Santiago, Chile) en volumen de 5 a 6 mL por animal. Las ovejas se desangraron inmediatamente durante al menos 5 minutos y se recolectaron muestras de tejido de riñón, hígado, bilis, grasa, músculo y cerebro. Los tejidos se almacenaron en hielo inmediatamente después de la recolección y se transfirieron a un congelador a -20 ° C dentro de las 24 h posteriores a la recolección. Los tejidos se descongelaron para su procesamiento para producir muestras molidas homogéneas y se almacenaron a -20 ° C hasta el análisis. Los tejidos de control se manipularon exactamente de la misma manera para medir la concentración tisular de IVM.



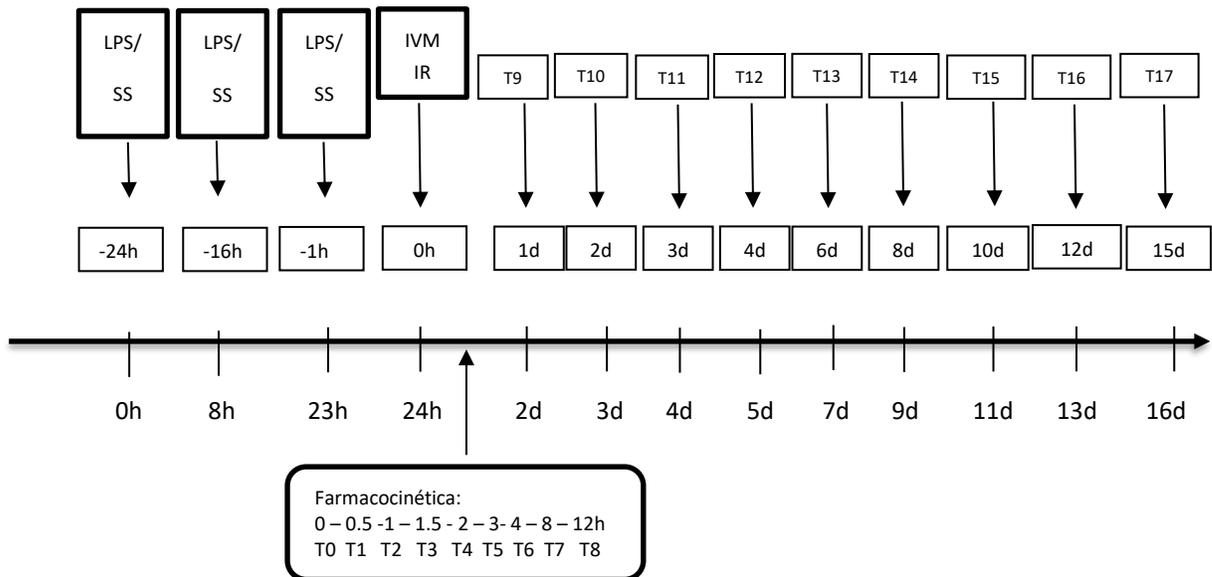
**FIGURA 7:** Esquema experimental para la extracción de muestras luego de la administración de IVM por vía subcutánea en ovinos

**Objetivo 4:** Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la farmacocinética plasmática de Ivermectina administrada por vía intraruminal (IR) en ovinos.

Otra de las vías disponibles para la administración de IVM en ovinos es la vía intraruminal (McKellar and Gokbulut, 2012), evidencia actual indica que tras la administración IR de IVM, se observan concentraciones significativamente superiores tanto en el contenido como en la mucosa del abomaso y del intestino delgado en comparación a la IVM administrada por vía SC, esta información es relevante ya que estos sitios son los principales lugares de ubicación de los parásitos gastrointestinales (Lloberas *et al.*, 2013). Por ello sería interesante observar la cinética plasmática de IVM cuando se administra por vía oral a animales que cursen con una respuesta inflamatoria.

Para dar respuesta a este objetivo se realizó el experimento 4.

**Experimento 4.** Se utilizaron 10 ovinos de raza Suffolk Down hembras y machos castrados clínicamente sanos, de 15 meses de edad y de  $36,3 \pm 2,8$  kg de peso corporal. Los animales fueron distribuidos en 2 grupos experimentales de 5 animales cada uno mediante un diseño de bloques al azar, considerando las variables raza, sexo, edad y peso corporal. El grupo I fue tratado con tres dosis endovenosas (a las 0, 8 y 23 horas después del inicio del estudio) de  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS de *E. coli* disuelto en solución salina al 0,9% libre de pirógenos. El grupo II, fue tratado con igual volumen de solución salina 0.9%(SS) y corresponde al grupo control. Veinticuatro horas después de la primera inyección de LPS ambos grupos recibieron  $0.2 \text{ mg}/\text{kg}$  de IVM (Ivomec® solución inyectable 1%, Merial®, Haarlem, Holanda) la cual se administró por vía intraruminal (IR), para lo cual se ubicó el lado izquierdo de la pared abdominal y luego de limpiar y desinfectar la zona se procedió a inyectar la IVM directamente a la cavidad ruminal mediante una jeringa de 3mL y aguja de 21G. Se colectaron muestras de sangre (5 mL) desde la vena yugular contralateral a la que se inyectó el fármaco a las 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 192, 240, 288, 360 horas post tratamiento con IVM, (FIGURA 8). Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos al vacío (SST™II Advance, BD Vacutainer®, Santiago, Chile) y luego centrifugadas a 3200 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada MIKRO22R (Hettich®, Alemania). El plasma obtenido se almacenó a -20°C hasta su análisis.



**FIGURA 8:** Esquema experimental para la extracción de muestras luego de la administración de IVM por vía IR en ovino.

## Condiciones Experimentales

### Registro de las Constantes Fisiológicas

Las constantes fisiológicas, frecuencia cardiaca (latidos por minuto), frecuencia respiratoria (ciclos por minuto) y temperatura rectal ( $T^{\circ}\text{C}$ ) fueron determinadas cada 15 minutos desde las 0 hasta 36 horas de iniciado el estudio. Estas se midieron con un monitor multiparámetro (Mek's, MP 800, Kangwon-do, New Global Leader, Korea), con electrodo adaptados para ovinos, adicionalmente se midió la temperatura corporal con termómetro clínico y las frecuencias con fonendoscopio (Litman®) para la verificación de los resultados. Se considero como indicador de fiebre un aumento de  $0,8^{\circ}\text{C}$  por sobre la temperatura rectal basal. Además, se midió la temperatura ambiental mediante un termómetro de máxima y mínima.

## **Recolección de muestras sanguíneas**

La recolección de muestras sanguíneas comprendió un periodo de 24 horas, donde se obtuvieron un total de 5 muestras por cada animal en estudio; las muestras se tomaron previo a la administración de LPS (T0); y a las 1 (T1), 4 (T2); 8 (T3); 12 (T4) y 24 (T5) horas posteriores a la primera administración de LPS tal como se esquematiza en la Figura 5. Se extrajeron 4 mL de sangre desde la vena yugular utilizando una jeringa de 5 mL de aguja de 21G. La sangre colectada se distribuyó en un tubo de con EDTA (1 mL), y en un tubo sin anticoagulante (3 mL), para la determinación y posterior análisis del hemograma el primero y para la determinación de los perfiles bioquímicos. Posteriormente, las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3200 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada MIKRO22R (Hettich®, Alemania), el plasma obtenido fue almacenado para su posterior análisis. Para determinar el perfil bioquímico el plasma se almacenó a 4 °C por 1 h y posteriormente a -20 °C hasta su análisis.

## **Determinación de las variables hematológicas, bioquímicas y marcadores inflamatorios**

### **Análisis del Hemograma**

El volumen globular (%) se determinó mediante el uso de tubos de microhematocrito los que se centrifugaron a 12000 rpm por 4 minutos. El recuento de leucocitos totales (leucocitos/ $\mu$ L), se determinó mediante la técnica de Hayem B (Feldman *et al.*, 2000). El recuento diferencial de leucocitos y el recuento de plaquetas se realizó mediante la observación directa de los frotis sanguíneos utilizando la tinción Panóptico rápido (Química analítica aplicada S.A España)

### **Análisis del Perfil Bioquímico**

Para determinar la actividad (Unidades por litro: U/L) de las enzimas de aspartato amino transferasa (AST) y gama glutamiltranspeptidasa (GGT), se

emplearon reactivos comerciales del laboratorio DiaSys® (Alemania), de acuerdo al método cinético-fotométrico estandarizado por la International Federation Of Clinical Chemistry (IFCC).

La medición de la actividad de estas enzimas se realizó usando un analizador bioquímico automático (Respons 920®, serie 920216, Alemania), a una longitud de onda primaria de 340 y secundaria de 405 nm para AST y de 405 y 700 nm para GGT.

Las concentraciones de proteínas totales (g/L) y albumina (g/L) se determinaron mediante el uso de reactivos comerciales del laboratorio DiaSys® (Alemania), a través de métodos fotométricos. Para la medición de albumina se utilizó el verde de bromo cresol, a una longitud de onda de 578 a 700 nm, mientras que las proteínas totales se determinaron por el método de Biuret a una longitud de onda de 546 nm.

La concentración de globulinas (g/L) fueron determinadas a través de la diferencia entre el valor de proteína total y el valor de albumina sérica.

### **Procedimientos analíticos**

La IVM fue analizada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detección de fluorescencia, después de la extracción en fase sólida, según los procedimientos descritos por Alvinerie *et al.*, (1995) y modificado por el laboratorio de farmacología de la Universidad de Concepción (Pérez *et al.*, 2006).

Las muestras de tejidos (1 g para hígado, riñón, musculo y cerebro, y 0,1 g para grasa), plasma (1 mL) y bilis (1 mL), fueron descongeladas, trituradas, molidas y homogenizadas para su análisis. Muestras libres de fármaco fueron sobrecargadas con solución estándar de IVM en acetonitrilo, para obtener concentraciones finales de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 ng de IVM/mL. El estándar

analítico puro de IVM (98,7% de pureza) se adquirió desde Sigma (Missouri, EE.UU.).

A las muestras sobrecargadas y a las muestras experimentales de riñón, músculo, hígado, cerebro, bilis y plasma se les adiciono 0,5 mL de agua grado HPLC y 2 mL de acetonitrilo, ambos a 4 °C, y se sometieron a agitación horizontal (Vortex) durante 30 minutos. Posteriormente, estas muestras se centrifugaron (centrífuga: Heraeus, Labofuge 200) a 12000 rpm a 4°C por 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante. Se realizo una segunda extracción a las muestras siguiendo los mismos procedimientos mencionados anteriormente.

A las muestras sobrecargadas y a las muestras experimentales de grasa se les adiciono 0,125 mL de agua HPLC y 0,5 mL de acetonitrilo (4°C) y se colocaron en un agitador termoregulado a 300 rpm por 20 minutos y a 35 °C, luego se colocaron en un baño de ultrasonido durante 5 minutos para posteriormente ser centrifugadas a 4000 rpm a 14 °C por 10 minutos.

El sobrenadante de cada muestra fue transferido a tubos de vidrio y al residuo solido se le adiciono 0,5 mL de acetona y se procedio a la agitación a 35 °C, ultrasonicación y centrifugación (4000 rpm a 4 C por 20 minutos). El sobrenadante obtenido se adiciono al anterior para luego agregarle 2 mL de agua HPLC, y dejarlo reposar por 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

### **Extracción en fase sólida**

Para la extracción en fase sólida el sobrenadante obtenido desde las muestras se traspasó mediante una micropipeta (Socorex) a una columna de separación en fase reversa (Supelclean C 18, Supelco), la cual fue acondicionada previamente con 2 mL de metanol y 2 mL de agua HPLC y luego secada a una presión de vacío de 2 mm Hg por cuatro minutos.

Posteriormente la muestra fue eluída con 2 mL de metanol y el eluído se recogió en tubos de ensayo. Este eluído se secó en un baño termorregulado a 60° C bajo flujo continuo de nitrógeno por 12 minutos. Finalmente, el residuo seco fue disuelto en 100 µL de N-Metilimidazol en acetonitrilo (1:1 v/v) y luego se sometió a una reacción de derivatización mediante una solución de anhídrido de trifluoroacético en acetonitrilo (1:2 v/v). Una vez ocurrida la reacción (30 segundos), se tomaron 100µL de esta solución y se inyectó en el cromatógrafo.

### **Condiciones cromatográficas**

La fase móvil estuvo compuesta por ácido acético (0.2 % en agua), acetonitrilo y metanol (2:64:34 v/v/v), la que se impulsó a una frecuencia de flujo de 1.5 mL/min a través de una columna de Supelcosil C 18 (5 µm; 0.46 cm x 15 cm, Supelco). Se utilizó un sistema de detección por fluorescencia a longitudes de onda de 383 nm de excitación y 447 nm de emisión (Detector de fluorescencia. Rf-10 AXL-, Shimadzu, Japón).

### **Validación de la metodología analítica**

La metodología analítica fue validada de acuerdo con los procedimientos descritos por Nuñez *et al.*, (2007).

### **Análisis farmacocinético**

Las concentraciones plasmáticas de IVM fueron analizadas utilizando un modelo farmacocinético no compartimental, mediante el programa PK solutions 2.0 (Farrier, 1997). La bondad de ajuste fue evaluada mediante la comparación de las concentraciones observadas con las concentraciones calculadas y la repartición de los residuos.

La concentración máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo de concentración máxima ( $T_{max}$ ) se obtuvieron de la observación directa de la curva de concentración plasmática en el tiempo, de cada animal.

Las vidas medias de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ), de distribución ( $t_{1/2\alpha}$ ) y de absorción ( $t_{1/2ab}$ ) fueron calculadas como:  $\ln 2/\beta$ ;  $\ln 2/\alpha$  y  $\ln 2/k_{ab}$ , respectivamente, donde:  $\beta$  corresponden a la constante de eliminación,  $\alpha$  corresponde a la constante de distribución y  $k_{ab}$  corresponde a la constante de absorción.

El área bajo la curva de la concentración plasmática en el tiempo (ABC) fue calculada desde el tiempo cero hasta el último tiempo de medición de la concentración usando el método de los trapecoides. El valor de ABC extrapolado al infinito se obtuvo dividiendo el valor de la última concentración de analito por la pendiente de la fase terminal de la curva concentración tiempo. El tiempo medio de residencia (TMR) se calculó por la regla trapezoidal lineal sin extrapolación al infinito usando la siguiente fórmula:

$$TMR = \frac{ABCM_{0 \rightarrow \infty}}{ABC_{0 \rightarrow \infty}}$$

Donde  $ABCM_{0 \rightarrow \infty}$  es el área bajo la curva de los momentos estadísticos, que corresponde al valor del área bajo la curva del producto del tiempo y de la concentración de la droga frente al tiempo desde 0 al infinito, y  $ABC_{0 \rightarrow \infty}$  es el área bajo la curva de la concentración de la droga en el tiempo, previamente descrita:

$$Vd = \frac{\text{Dosis}}{ABC \times \beta}$$

El clearance total corporal (CL<sub>t</sub>) fue calculado como:

$$CL_t = \frac{\text{Dosis}}{ABC}$$

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como medias y error estándar de la media (EEM), y se compararon mediante análisis de varianza (ANDEVA) para mediciones repetidas asociadas con una prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró un valor de  $P \leq 0,05$  para establecer diferencias estadísticamente significativas.

Todos los procedimientos experimentales realizados en animales fueron aprobados por el Comité de Bioética, resolución CBE-49-17 de la facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Campus Chillan.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inoculación de animales con agentes bacterianos puros o mixtos ha sido una herramienta común para el estudio de los mecanismos de la sepsis animal, y se utiliza para desarrollar un modelo de enfermedad reproducible y rápido en comparación con los modelos de sepsis humana (Buras *et al.*, 2005). La utilidad del LPS como modelo de exposición se debe a que es relativamente barato y fácil de reproducir, ya que no siempre es posible desarrollar modelos fiables de enfermedades para realizar estudios farmacocinéticos en animales productores de alimentos (Post *et al.*, 2003). El modelo utilizado en el presente estudio permitió la generación de una RFA con tres dosis repetidas de LPS para simular una respuesta inflamatoria a la infección. Esto se hizo con el fin de caracterizar los cambios en las variables fisiológicas, hematológicas y bioquímicas en ovejas sanas.

### **Efecto de la administración de una dosis de 1 µg/kg por vía intravenosa de lipopolisacárido de *E. coli* sobre las variables hematológicas, fisiológicas y bioquímicas en ovinos.**

En la FIGURA 9a se muestran los promedios de temperatura corporal (T°C) observados en ambos grupos de animales. El grupo experimental y el grupo de control tenían una T°C basal de  $39,6 \pm 0,12$  y  $39,7 \pm 0,1$  ° C, respectivamente. En el grupo de control después de la administración de la solución salina, la T°C se mantuvo dentro de los rangos normales durante todo el período de estudio. Por el contrario, las ovejas del grupo experimental presentaron una respuesta febril como respuesta a la administración de la endotoxina. El aumento de temperatura se inició 1 h después de la administración del LPS y se mantuvo hasta 5,5 hpi, alcanzando una diferencia máxima de 1,7 ° C a las 3,5 h después de la primera inyección de LPS (hpi), de 1,3 ° C a las 1,25 hpi después de la

segunda inyección y de 1,2 °C a las 1,4 hpi después de la tercera inyección. Estas diferencias fueron significativas con respecto a la T°C basal ( $P < 0,05$ ) y los valores observados en el grupo de control ( $P < 0,05$ ). El retorno de la T°C a la línea basal se produjo a las 6 hpi después de cada aplicación de LPS. Jones *et al.*, (2000) obtuvieron resultados similares en ovejas. Resultados similares han sido descritos en conejos por Huang *et al.*, (2008), Marca *et al.*, (2009) y Peñailillo *et al.*, (2016).

Se ha demostrado que el aumento inicial de temperatura se debe a la participación de citocinas pirogénicas derivadas de células reticuloendoteliales y fagocitos. Estas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, interferones y factor de necrosis tumoral) (Prajitha *et al.*, 2018), entran en el órgano circunventricular del cerebro; que es un área desprovista de barrera hematoencefálica y se unen a sus receptores en las células microendoteliales, ya sea para desencadenar la fiebre directamente (Dalal and Zhukovsky, 2006), o para inducir la liberación de PG (Prajitha *et al.*, 2018). Alternativamente se ha propuesto que altas dosis de LPS interrumpen la funcionalidad de la barrera hematoencefálica, de modo que las citocinas pueden ingresar al cerebro por difusión o mediante mecanismos de transporte para interactuar con sus receptores en la superficie de las células gliales y activar reacciones inflamatorias asociadas con endotoxinas u otros estímulos dañinos (Prajitha *et al.*, 2018). Además, se ha establecido que el aumento en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias se asocia a apoptosis neuronal, disfunción neuroglial, o a la promoción del reclutamiento de más células inflamatorias, con la perpetuación de la alteración de permeabilidad de la BHE (Von Bernhardt, 2004).

El retraso en alcanzar el pico de temperatura se explica por la necesidad de síntesis y/o presencia de prostaglandina E2 (PGE2) en el centro termorregulador del organismo, se ha demostrado que el tratamiento con LPS en la cámara subcutánea de los conejillos de indias dio como resultado una

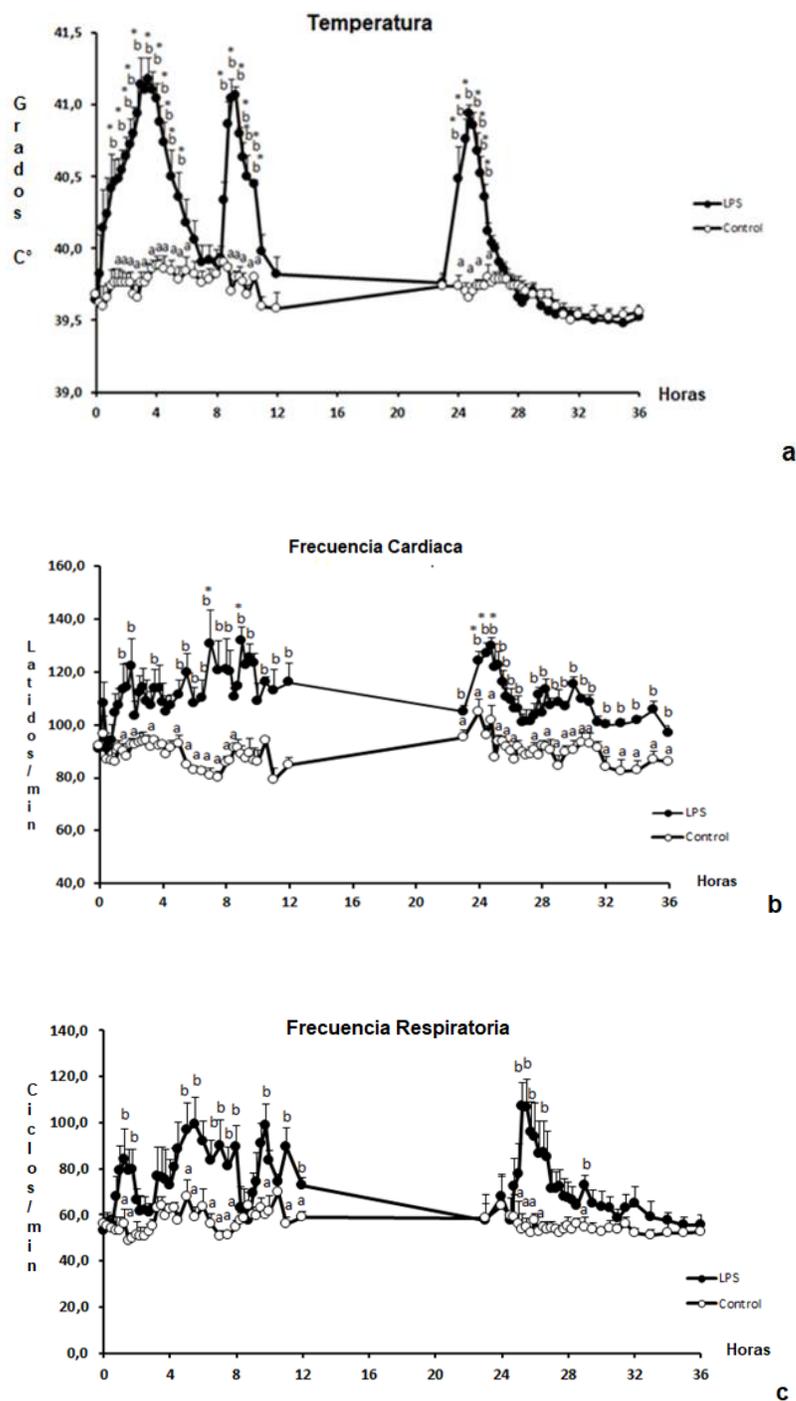
producción excesiva de PGE<sub>2</sub>, cuyas señales llegaron al cerebro, a través de fibras nerviosas aferentes (Rummel *et al.*, 2005), los mediadores inflamatorios liberados transmiten mensajes al Organum Vasculosum de la Lamina Terminal (OVLT) asociados con el área preóptica hipotalámica anterior (POA) del cerebro, a través de señales nerviosas sensoriales siendo este el centro termorregulador del organismo. En respuesta a estos estímulos pirogénicos, las células endoteliales cerebro-microvasculares liberan citocinas y PGE<sub>2</sub> adicionales generando un estímulo febril mayor (Prajitha *et al.*, 2018). El menor tiempo para alcanzar el segundo aumento de temperatura se debe a que las citocinas ya están presentes en la zona, por lo que no es necesaria su síntesis y transferencia al hipotálamo, ya que, de acuerdo con estudios previos, se ha demostrado que algunas citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y la interleucina-6 (IL-6) permanecen elevadas desde 1 a más de 7 h después de la inyección de LPS (Pacheco-Lopez *et al.*, 2008). El retorno de la T°C a los valores iniciales se produjo a las 6 h después de cada aplicación de LPS. Se describe que la recuperación de la temperatura corporal hacia valores basales podría explicarse por un efecto dosis-dependiente de LPS, ya que a dosis bajas la fiebre presenta un patrón de temperatura monofásico con una rápida recuperación después de alcanzar el pico de temperatura, a diferencia de lo que ocurre con una dosis moderada a alta de LPS, donde se han observado patrones bifásicos o trifásicos con una recuperación más lenta de la temperatura basal (Rudaya *et al.*, 2005). Esto ha sido previamente demostrado por Jacobsen *et al.*, (2005), quienes administraron dosis crecientes de LPS de 10-100-1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a vacas, y encontraron que estas respondían con un patrón de T°C mono, bi y trifásica, respectivamente, correlacionando las dosis con la recuperación de T°C basal. Estos patrones de T°C se explican por diferentes "ondas" de síntesis de PGE<sub>2</sub> (Blatteis *et al.*, 2005).

Los valores de frecuencia cardíaca (FC) correspondientes a los grupos control y tratado con LPS se presentan en la FIGURA 9b. En el grupo control, la

FC se mantuvo dentro de los rangos fisiológicos normales durante todo el estudio, sin presentar diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) con respecto al valor basal ( $92 \pm 3,2$  latidos por minuto). En cambio, se observaron aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) en la FC del grupo experimental en comparación con el valor basal ( $90,8 \pm 3,18$  latidos por minuto), a las 7 - 9,5 - 24,5 - 24,75 hpi de LPS. Además, la comparación estadística de los promedios observados entre ambos grupos mostró que hubo diferencias significativas en la frecuencia cardíaca durante una gran parte del periodo de registro de la FC, ocurriendo la mayor diferencia 1 hpi de la segunda dosis de LPS ( $P < 0,05$ ). La taquicardia presente en estos animales fue similar a la descrita por Yates *et al.*, (2011), quienes encontraron aumentos en la frecuencia cardíaca en ovejas tratadas con  $1,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS. Plessers *et al.*, (2015) obtuvieron resultados similares en terneros tratados con dosis de  $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  LPS. El aumento sostenido y la variabilidad que presenta la FC, se asocia con una de desregulación autonómica cardíaca como consecuencia de la inflamación sistémica (Foteinou *et al.*, 2011); lo que está relacionado con un desacoplamiento entre el sistema nervioso autónomo y el corazón (Scheff *et al.*, 2014) específicamente un desacoplamiento parcial de las células del marcapasos cardíaco del control neural autónomo (Gholami *et al.*, 2012), esto se ve reflejado en un aumento de la actividad simpática cardíaca así como una atenuación parasimpática, siendo este aumento en el tono simpático la responsable de los cambios en la FC observados (Reyes-Lagos *et al.*, 2019)

La FIGURA 9c muestra los promedios de la frecuencia respiratoria (FR) para ambos grupos experimentales. En el grupo control, se mantuvo dentro de los rangos fisiológicos normales durante todo el estudio, sin diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) con respecto a la FR basal ( $56 \pm 3,7$  ciclos por minuto). Sin embargo, en el grupo experimental, hubo diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto al valor basal ( $53,2 \pm 3,7$  ciclos por minuto), a las 25,5 y 25,75 hpi. La frecuencia respiratoria mostró una tendencia similar a la frecuencia cardíaca y fue mayor en los animales tratados

con LPS. La comparación de promedios mostró que hubo diferencias significativas en la frecuencia respiratoria entre los dos grupos durante gran parte del estudio. Algunos animales tratados tuvieron periodos de tos leves. El aumento de la frecuencia respiratoria representa la respuesta del organismo a un aumento de T°C como una forma de aumentar la disipación de calor a través del jadeo y la taquipnea. Mientras tanto, los períodos de tos se deberían a una lesión y/o irritación del árbol respiratorio causado por la endotoxina. A las 8 hpi de la primera dosis de LPS se normalizó la frecuencia respiratoria, lo que coincide con la disminución de T°C, se postula que la acción antiinflamatoria de la proteína C reactiva (PCR) ayudaría en el cese de la sintomatología respiratoria (*Buras et al., 2005*). La PCR es una vía importante en la regulación de la coagulación y la inflamación durante la septicemia, ya que tiene acción antiinflamatoria y también mejora la perfusión tisular (*Buras et al., 2005*). Se han realizado modelos de estudios en ratas administrando LPS por vía intravenosa para determinar el efecto de la PCR sobre la lesión pulmonar. Estos estudios demostraron que la PCR exógena reduce la lesión pulmonar inducida por LPS mediante la inhibición de la producción de citocinas y la activación de leucocitos (*Buras et al., 2005*).



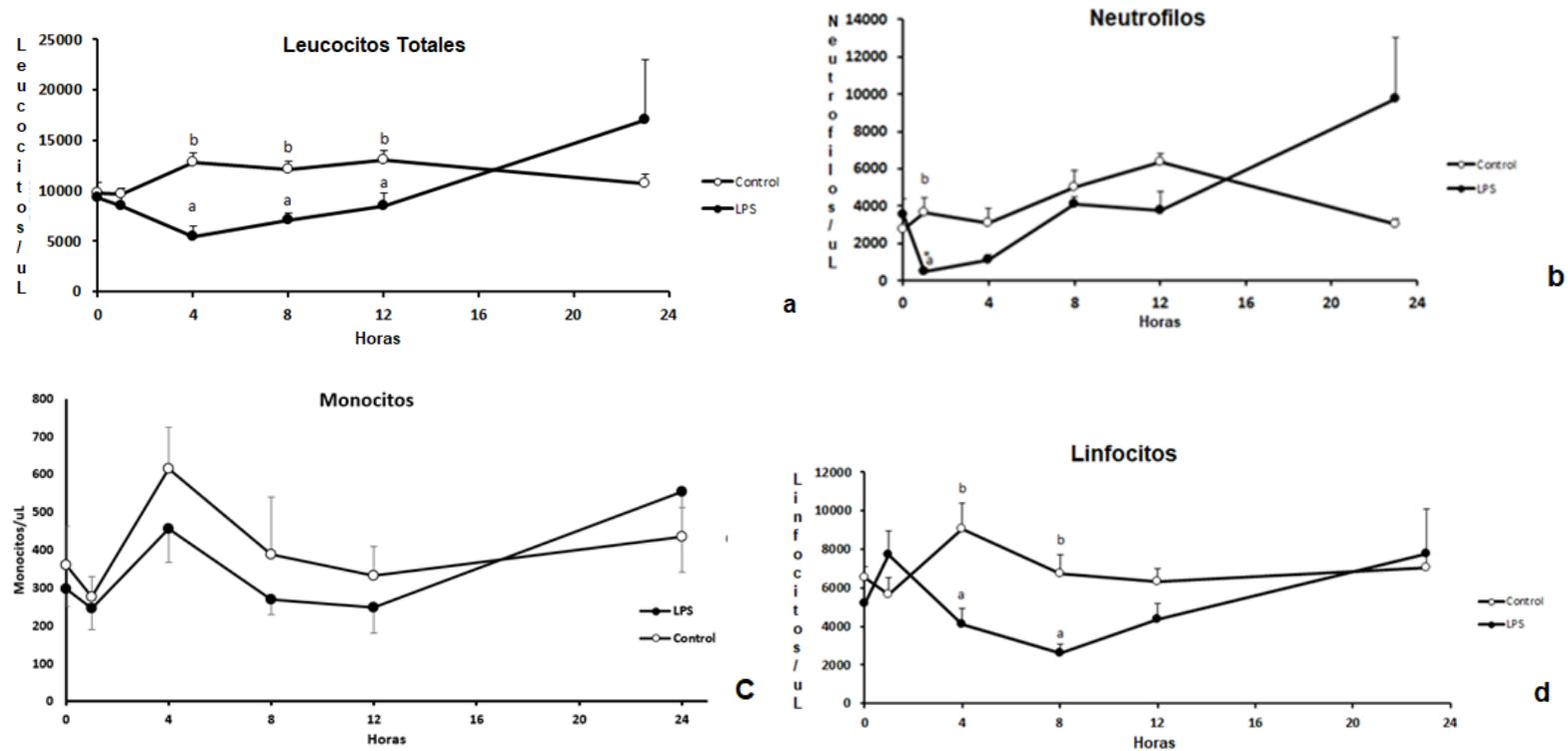
**FIGURA 9:** Promedio de temperatura rectal (a), frecuencia cardíaca (b) y frecuencia respiratoria (c) en ovejas del grupo control y las tratadas LPS de *E. coli* LPS (n = 5). \* p<0,05 vs basal. Letras diferentes en sentido vertical p<0,05.

Los recuentos en el promedio de leucocitos totales por grupo se presentan en la FIGURA 10a. El grupo de control tenía un recuento basal total de glóbulos blancos de  $9760 \pm 1116,7$  células/ $\mu\text{L}$ , manteniéndose en promedios similares durante todo el período de muestreo, mientras tanto, el grupo experimental tuvo un recuento inicial de  $9280 \pm 723$  leucocitos/ $\mu\text{L}$ , sin diferencias estadísticas en los valores basales entre ambos grupos. Sin embargo, a las 4 hpi, se observó una disminución en el recuento de glóbulos blancos en las ovejas tratadas con LPS, lo que resultó en una leve leucopenia. No obstante, esta diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto al valor basal, pero sí fue estadísticamente significativa con respecto a los valores del grupo control ( $P < 0,05$ ). Esta respuesta celular temprana se atribuye principalmente a la infiltración y almacenamiento de glóbulos blancos en órganos como el hígado y el bazo, generando en este último la esplenomegalia característica de la sepsis Gram negativa (Gridley *et al.*, 2007).

En el presente estudio, la leucopenia inicial se debe a una disminución en el recuento de linfocitos cuyos valores fueron inferiores al 50% del valor basal, que se observa en la FIGURA 10d. Peñailillo *et al.*, (2016) encontraron resultados similares en conejos tratados con LPS, donde se observó una disminución de leucocitos a las 4 hpi y luego mostró un aumento entre 12 y 24 hpi. En el grupo experimental, la leucopenia inicial fue seguida por un aumento de leucocitos desde las 8 a las 24 hpi, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ) a las 8 y 12 hpi. Estos resultados son consistentes con los reportados por Rose and Semrad (1992), Bieniek *et al.*, (1998), Bannerman *et al.*, (2003) y Jacobsen *et al.*, (2005) en bovinos. Peñailillo *et al.*, (2016), también observaron un aumento en el recuento de neutrófilos a partir de las 12 h posteriores al tratamiento en conejos. En literatura, se piensa que este fenómeno puede atribuirse a un efecto sinérgico entre LPS y la liberación de corticosteroides en el organismo. Esta última condición lleva al

animal a producir un mayor nivel de citocinas quimioatrayentes como la IL-1 y TNF- $\alpha$ ), que estimulan la liberación de células inmaduras de la médula ósea a la circulación (Altenburg *et al.*, 2002).

Los promedios de recuento de neutrófilos se presentan en la FIGURA 10b. El grupo de control tuvo un recuento inicial de  $2763,4 \pm 538,8$  neutrófilos/ $\mu\text{L}$ , manteniéndose en valores similares durante todo el período de muestreo, en tanto el grupo experimental tuvo un recuento inicial de  $3526,8 \pm 844,5$  neutrófilos/ $\mu\text{L}$ , sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los valores iniciales en ambos grupos. No obstante, en ovejas tratadas con LPS, se observó una disminución en el recuento de neutrófilos después de 1 hpi, lo que resultó en neutropenia leve, la cual se debe a la infiltración de estas células en órganos linfoides como el bazo, el cual tiene una importante función en la respuesta inmune (Gridley *et al.*, 2007). Esta diferencia fue estadísticamente significativa con respecto al valor inicial y al grupo de control ( $P < 0,05$ ). Luego, a partir de las 4 hpi se observó un aumento en el número de neutrófilos que llegan a su pico a las 24 hpi, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor basal y al grupo control ( $P < 0,05$ ). Los promedios de recuento de monocitos se presentan en la FIGURA 10c, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio.



**FIGURA 10:** Recuento de Leucocitos totales (N° de leucocitos  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (a), recuento de neutrófilos (N° de neutrófilos  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (b), recuento de Monocitos (N° de monocitos  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (c), recuento de linfocitos (N° de linfocitos  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (d) en ovejas de control y tratadas con LPS de *E. coli* ( $n = 5$ ).

\* $p < 0,05$  vs basal, a,b: letras diferentes en sentido vertical  $p < 0,05$

**TABLA 3:** Volumen globular, hemoglobina, recuento de plaquetas, actividad enzimática AST y GGT en ovinos del grupo control y en ovinos tratadas con LPS de *Escherichia coli* (Media  $\pm$  SEM)

Variable	Grupo control (n = 5)						Grupo tratado (n = 5)					
	Tiempo en horas						Tiempo en horas					
	0	1	4	8	12	24	0	1	4	8	12	24
VG (%)	33 $\pm$ 1,7	30,8 $\pm$ 1,1	31,6 $\pm$ 0,7	30,2 $\pm$ 0,6	32,2 $\pm$ 1,4	33,6 $\pm$ 1,2	32,6 $\pm$ 0,4	31,6 $\pm$ 0,9	33 $\pm$ 0,3	30 $\pm$ 0,5	32,2 $\pm$ 0,7	32,3 $\pm$ 1,3
Hemoglobina (g/dL)	10,9 $\pm$ 0,55	10,3 $\pm$ 0,39	10,5 $\pm$ 0,2	10,1 $\pm$ 0,21	10,7 $\pm$ 0,46	11,2 $\pm$ 0,38	10,9 $\pm$ 0,11	10,5 $\pm$ 0,31	11 $\pm$ 0,08	9,9 $\pm$ 0,16	10,7 $\pm$ 0,23	10,7 $\pm$ 0,43
Plaquetas (uL)	285,2 $\pm$ 45	282,4 $\pm$ 56	333 $\pm$ 26	311 $\pm$ 60	290,2 $\pm$ 69	286,8 $\pm$ 49	313,2 $\pm$ 54	321,4 $\pm$ 51	325 $\pm$ 32	220 $\pm$ 27	145,2 $\pm$ 26	244,8 $\pm$ 41
AST (U/L)	166,2 $\pm$ 57,7	121,2 $\pm$ 15,8	127 $\pm$ 18,2	129 $\pm$ 15,7	129,6 $\pm$ 12,3	127,2 $\pm$ 13,3	86,2 $\pm$ 7,9	103,8 $\pm$ 8,4	117 $\pm$ 6,9	123 $\pm$ 9,6	126,3 $\pm$ 13,7	119 $\pm$ 10,6
GGT (U/L)	86,8 $\pm$ 21,2	79,4 $\pm$ 10,8	80 $\pm$ 11,5	82 $\pm$ 11,3	80,6 $\pm$ 11,7	79,6 $\pm$ 12,7	73 $\pm$ 6,9	74 $\pm$ 4,8	79,2 $\pm$ 4,9	75,6 $\pm$ 2,9	77,2 $\pm$ 3,97	80,6 $\pm$ 1,77

En la TABLA 3 se muestran los promedios del volumen globular (VG%), concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, actividad enzimática de las enzimas GGT y AST obtenidos en ambos grupos. El análisis estadístico no mostró variaciones significativas en el volumen globular medio (GV), la hemoglobina y el recuento de plaquetas en ovejas tratadas con LPS. Estos resultados coinciden con los reportados por Bieniek *et al.*, (1998) en terneros y por Peñailillo *et al.*, (2016) en conejos tratados con LPS. Sin embargo, Yates *et*

*al.*, (2011) describen un aumento de VG en ovejas tratadas con LPS, efecto atribuido a la contracción esplénica que resulta en la liberación de eritrocitos al torrente sanguíneo.

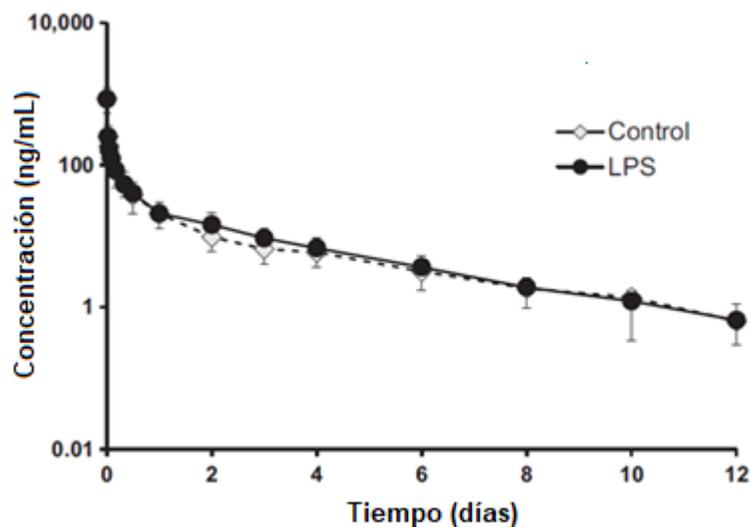
La actividad de las enzimas AST y GGT no mostró variaciones significativas con respecto a su valor basal después de la administración de LPS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ramírez (2011) en ovinos tratados con dosis similares de LPS. Por tanto, se infiere que la dosis de LPS no fue suficiente para provocar alteraciones en la funcionalidad hepática. Sin embargo, se han observado incrementos significativos en los promedios de estas enzimas en conejos tratados con altas dosis de LPS (100 µg/kg) (Elmas et al., 2008).

Por lo tanto, a modo de resumen podemos señalar que la administración de LPS de *E. coli* generó inflamatoria aguda caracterizada por aumentos en la TC, asociados a incrementos en la FC y FR, cambios hematológicos con disminución en el recuento de leucocitos en las primeras horas post-administración de la endotoxina las que posteriormente aumentaron hacia el final del estudio. No se observaron cambios en las variables de bioquímica clínica sanguínea analizadas. Se concluye que mediante la administración de LPS de *E. coli* es posible desarrollar un modelo reproducible y útil para estudiar el efecto de la infección y la inflamación generadas por productos bacterianos sobre las características farmacocinéticas de fármacos de uso veterinario, como es el caso del antiparasitario IVM.

### **Efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de Ivermectina administrada por vía intravenosa (IV) en ovinos.**

En esta tesis se han estudiado los efectos del RFA inducida por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* sobre el perfil farmacocinético de

IVM en ovinos. Según nuestro conocimiento actual, no hay informes disponibles sobre los efectos de la RFA inducida por dosis bajas de LPS de *E. coli* sobre la farmacocinética de IVM en ovejas. Se eligió la vía intravenosa ya que representa una ruta de administración de fármacos en la cual se evita la influencia de los procesos de absorción sobre las concentraciones plasmáticas de la droga (McKellar and Gokbulut, 2012).



**FIGURA 11:** Concentraciones plasmáticas (ng/mL) de ivermectina administrada por vía intravenosa a dosis de 0,2 mg/kg en ovinos controles y en ovinos tratados con LPS de *E. coli* (n = 5).

La administración intravenosa de una dosis única de IVM (0,2 mg/kg) en ovinos control dio lugar a concentraciones plasmáticas máximas de  $865,0 \pm 127,2$  ng/mL las que disminuyen gradualmente hasta alcanzar concentraciones de  $0,6 \pm 0,13$  ng/ml a los 12 días post-inyección (FIGURA 11). En los ovinos tratados con LPS, se obtuvo una concentración máxima de  $849,6 \pm 145,6$  ng/mL que posteriormente disminuyó a valores de  $0,7 \pm 0,18$  ng/mL a los 12 días (FIGURA

11). Como se muestra en la FIGURA 11 y TABLA 4, la administración de tres dosis de LPS en ovinos no modificó las concentraciones plasmáticas ni las variables farmacocinéticas de IVM en comparación con los valores observados en ovinos control tratados con solución salina. Estos resultados son diferentes a los observados en cerdos tratados con LPS para fármacos altamente lipofílicos como enrofloxacino donde se observó una disminución del aclaramiento plasmático, con el correspondiente aumento de la vida media de eliminación y el ABC (Post *et al.*, 2003). Resultados similares se observaron en terneros tratados con oxitetraciclina donde la endotoxina generó una disminución marcada en la concentración sérica de 12 a 24 h con una disminución en la vida media de eliminación y en el TMR en terneros (Kumar y Malik, 2003). Otro estudio en ovinos tratados con florfenicol se observó un aumento en el ABC y la vida media de eliminación (Pérez *et al.*, 2015). Estos estudios sugieren que los efectos de la endotoxina sobre las propiedades farmacocinéticas de los fármacos no son idénticos, y las propiedades fisicoquímicas de las moléculas del fármaco y la especie animal en la que se llevan a cabo estos estudios también son un factor importante a considerar (Kumar y Malik, 2003).

**TABLA 4:** Parámetros farmacocinéticos de ivermectina después de la administración intravenosa de 0,2 mg/kg de peso corporal en ovinos controles y en ovinos tratados con LPS de *E. coli* (n = 5).

Parámetro	Control	LPS	Valor de P
t 1/2 $\alpha$ (días)	0,24 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	0,099
t 1/2 $\beta$ (días)	2,85 $\pm$ 0,39	2,34 $\pm$ 0,05	0,29
ABC 0-t (ng-día/mL)	114,5 $\pm$ 15,004	124,2 $\pm$ 18,7	0,59
ABC 0- $\infty$ (ng-día/mL)	117,4 $\pm$ 14,78	126,4 $\pm$ 19,2	0,61
Vd (mL/Kg)	875,6 $\pm$ 287,05	624,6 $\pm$ 121,5	0,34
TMR (días)	2,27 $\pm$ 0,29	2,05 $\pm$ 0,11	0,577
Cl <sub>t</sub> (mL/kg/día)	187,1 $\pm$ 35,4	202,8 $\pm$ 43,7	0,6

t $\frac{1}{2}\alpha$ : Vida media de distribución, t $\frac{1}{2}\beta$ : Vida media de eliminación, TMR: Tiempo medio de residencia, ABC: área bajo la curva de concentración plasmática a lo largo del tiempo, Vd: Volumen de distribución, Cl<sub>t</sub>: Clearance.

La IVM es un fármaco altamente lipofílico que se distribuye ampliamente desde el torrente sanguíneo hacia diferentes tejidos (McKellar and Benchaoui, 1996) con una mayor afinidad hacia el tejido adiposo, el que representa un importante reservorio del fármaco y que pueden influir en su comportamiento farmacocinético y en la persistencia de concentraciones efectivas en el organismo (Lo *et al.*, 1985); por tanto, los parámetros farmacocinéticos pueden verse influenciados por la condición corporal del animal (Atta y Abo-Shihada, 2000). En este estudio, los ovinos se caracterizaron por tener un promedio condición corporal de 4 a 5, con un alto contenido de grasa corporal. Se describe que entre los factores que controlan la disposición de las lactonas macrocíclicas (LM) la lipofilia de estos fármacos es un factor determinante en modular la tasa de intercambio entre la sangre y los tejidos (Lespine, 2013). Se ha propuesto que

la alta solubilidad en lípidos de las avermectinas y una gran reserva de grasa en los ovinos puede contribuir a la persistencia prolongada de IVM en el plasma a bajas concentraciones, probablemente debido a que el tejido graso se caracteriza por presentar una baja irrigación sanguínea (Atta y Abo-Shihada, 2000).

El peso corporal representa un factor importante que modifica los parámetros farmacocinéticos de los fármacos. En este estudio, las vidas medias de eliminación fueron  $2,85 \pm 0,39$  días (control) y  $2,34 \pm 0,05$  días en ovinos tratados con LPS, estos valores son superiores a los obtenidos por Álvarez *et al.*, (2008) y Ballent *et al.*, (2007) de 1,33 y 0,91 días, respectivamente. Estas diferencias son debido a las diferencias de edad y peso corporal de los animales; en nuestro estudio, se utilizaron ovinos adultos de  $55,0 \pm 3,3$  kg de PC, mientras que Álvarez *et al.*, (2008) y Ballent *et al.*, (2007) utilizaron ovinos jóvenes de entre 25 y 30 kg.

El TMR es otro parámetro que permite describir la persistencia de un fármaco en el organismo (Riviere, 1999). Los valores observados de TMR para el grupo tratado con LPS ( $2,05 \pm 0,11$  días), no son significativamente diferentes de los observados en el grupo control ( $2,27 \pm 0,29$  días). Mientras que valores de TMR de 1 día se han descrito en ovinos jóvenes por Ballent *et al.*, (2007) y Lifschitz *et al.*, (2009). Estas diferencias son consistentes con los reportes anteriores, donde se ha descrito una correlación positiva entre el peso corporal, el tiempo de vida media de eliminación y el TMR (McKellar & Gokbulut, 2012).

El volumen de distribución es un parámetro farmacocinético usado para cuantificar la distribución de un medicamento en todo el cuerpo posterior a la administración vía oral o parenteral. No sólo es un parámetro esencial en los cálculos farmacocinéticos, sino que también es un concepto útil en la fisiología del organismo (Riegelman *et al.*, 1968). Con respecto a este concepto, una alta liposolubilidad, baja tasa de unión a proteínas plasmáticas o un alto porcentaje de unión a macromoléculas extracelulares están asociadas a una mayor

distribución del fármaco en tejidos como es el caso de la ivermectina (Baggot, 2001).

En este estudio el volumen de distribución fue de  $875,6 \pm 287,05$  mL/día/kg inferior a lo reportado por Álvarez et al., (2008) y por Ballent et al., (2007), que describen valores de  $3850 \pm 1300$  mL/día/kg y de  $4740 \pm 870$  mL/día/kg respectivamente. Se ha descrito que el volumen de distribución tiene una relación inversamente proporcional con el peso corporal, variable que explica estos valores, ya que en el presente estudio se utilizaron ovinos de mayor peso corporal (McKellar y Gokbulut, 2012). Sin embargo, es bien sabido que fármacos liposolubles luego de ser administrados por vía intravenosa tienen mayor facilidad para distribuirse hacia órganos más irrigados como son cerebro, corazón, hígado y riñones, en menor proporción lo hace hacia el músculo y con mayor lentitud hacia la grasa y tejidos poco irrigados como tendones.

El Clearance corporal es un parámetro farmacocinético que define la capacidad del organismo para eliminar al fármaco, es decir, mientras mayor sea el Clearance corporal, el organismo eliminará de manera más rápida y eficiente el fármaco. Está bien establecido que fármacos altamente lipofílicos y que presentan un amplio volumen de distribución, presentan un menor clearance corporal. IVM es un fármaco altamente liposoluble y que presenta una escasa tasa metabólica siendo eliminado casi en su totalidad por vía biliar como fármaco original, representando la vía urinaria menos del 3% del total, independiente de la vía de administración utilizada, esto debido a que posterior a ser filtrada por el glomérulo, este antiparasitario experimenta una alta reabsorción tubular por las características fisicoquímicas que posee (Ali y Hennessy, 1996). En este estudio el valor del Clearance fue de  $187,1 \pm 35,4$  mL/kg/día menor a lo reportado por Álvarez et al., (2008) y Ballent et al., (2007) con valores de  $1970 \pm 720$  mL/día/kg y de  $3540 \pm 590$  mL/día/kg respectivamente. Esto explica la mayor permanencia del fármaco en concentraciones detectables, ya que en este estudio se

detectaron concentraciones del fármaco hasta el último tiempo de muestreo (12 días), mientras que Álvarez et al., (2008) y Ballent et al., (2007) detectaron el fármaco hasta los 10 y 11 días respectivamente. La mayor persistencia de las concentraciones plasmáticas de IVM en los animales del presente estudio, se explica por su alta lipofilia, elevada afinidad por el tejido adiposo y unión a las lipoproteínas plasmáticas, la que al administrarse en animales adultos con alto contenido graso, determina valores de clearance menores a los observados en los estudios de Álvarez et al., (2008) y Ballent et al., (2007), quienes usaron animales jóvenes de menor peso corporal y con menor cobertura de tejido adiposo.

La administración de LPS puede afectar potencialmente todos los procesos farmacocinéticos de un fármaco, que van desde alteraciones en el intestino, en la funcionalidad renal o hepática; disminución en los niveles de proteína plasmática, cambios en permeabilidad vascular, o niveles disminuidos de citocromo P450 (Post *et al.*, 2003). A pesar de los cambios fisiopatológicos inducidos por la administración sistémica de LPS en los ovinos del presente estudio, no hubo modificaciones significativas en la disposición plasmática de IVM cuando se compraron los parámetros farmacocinéticos observados en los animales control y los tratados con LPS.

Considerando que ambos grupos de ovinos tenían una condición corporal similar con un alto contenido de grasa corporal, es probable que los posibles cambios en el flujo sanguíneo al tejido adiposo inducido por la administración de LPS no fueron suficientes para producir un cambio significativo en la distribución sistémica de la IVM. El uso de mayores dosis de IVM administrada podría generar diferencias en la tasa de traspaso desde la sangre a los reservorios corporales del fármaco, ya que se sabe que las propiedades farmacocinéticas dependen de la dosis administrada, con un aumento lineal en el ABC al aumentar la dosis (Canga *et al.*, 2009)

## **Efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática y distribución tisular de Ivermectina administrada por vía subcutánea (SC) en ovinos.**

En la presente investigación se han estudiado los posibles efectos de la RFA inducida por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* sobre la farmacocinética y la distribución tisular de IVM administrada por vía SC en ovinos y representa el primer informe sobre el estudio de los efectos de la endotoxemia inducida por LPS de *E. coli* sobre la farmacocinética y la distribución tisular de IVM cuando se administra por esta vía en ovinos. Estudios previos han demostrado que la inyección SC de IVM en caprinos, equinos, ovinos y bovinos es la vía de administración más eficiente en términos de biodisponibilidad, es decir el porcentaje del fármaco administrado que se absorbe al torrente sanguíneo es mayor al compararlo con la vía tópica “pour on”, o la vía oral (Lespine *et al.*, 2005; Gokbulut *et al.*, 2010; McKellar y Gokbulut, 2012), también confiere una mayor disponibilidad en el sitio blanco y cabría esperar una mayor eficacia antiparasitaria (McKellar y Gokbulut, 2012).

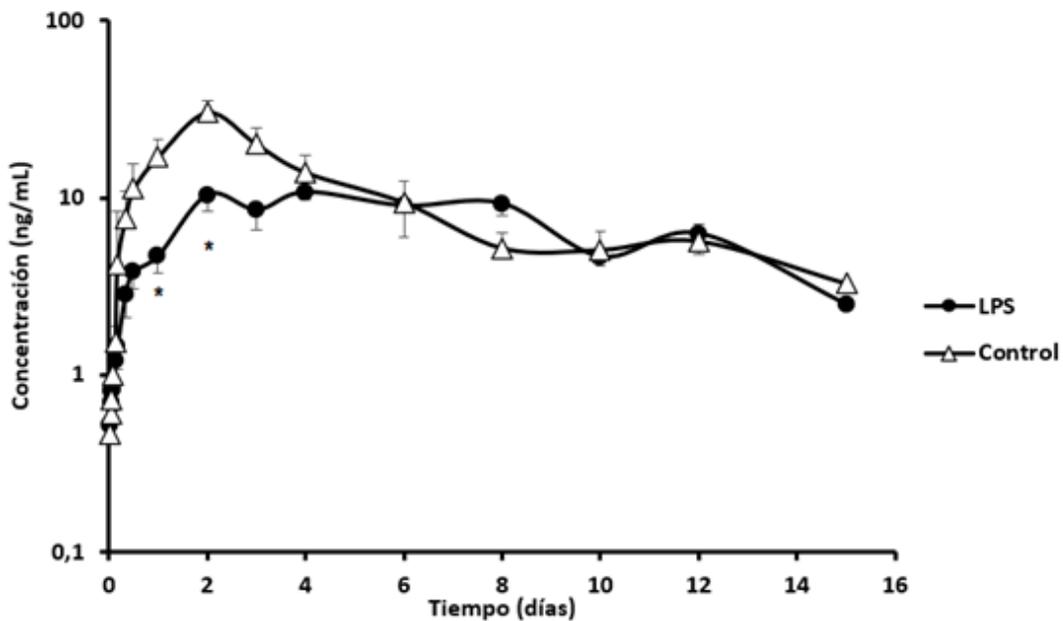
En la FIGURA 12 se muestran las concentraciones plasmáticas (promedio  $\pm$  SEM) de IVM versus tiempo en ovinos control y tratados con LPS. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de ovinos en sus concentraciones plasmáticas. Estas diferencias se observaron a las 24 y a las 48 horas de administrada la IVM, siendo menores en el grupo tratado con LPS ( $P \leq 0,05$ ), además se observaron diferencias con tendencia a ser significativas ( $P \leq 0,07$ ) a las 72 horas posteriores a la administración de IVM. Al comparar las concentraciones plasmáticas de IVM se observó que existe diferencia en los promedios observados durante la fase de absorción entre ambos grupos de ovejas. Por lo tanto, estos resultados indican que la respuesta aguda inducida por LPS modificó la fase de absorción de IVM cuando se administró por vía SC en ovejas.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) al comparar los promedios de concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) entre ambos grupos experimentales. En el grupo control la concentración plasmática máxima de IVM fue de  $30,36 \pm 4,9$  ng/mL, mientras que en el grupo tratado con LPS fue de  $10,4 \pm 2,06$  ng/mL con un valor de  $P$  de 0,01 a los 2 días de aplicado el fármaco. Atta and Abo-Shihada, (2000), y Myers *et al.*, (2021) describen resultados menores a los observados en ovinos tratados con la misma dosis por vía subcutánea, observándose concentraciones máximas de  $16,3 \pm 2,15$ , y  $9,2 \pm 4,4$  ng/mL a los 2,6 días posteriores a la administración de IVM.

La menor concentración plasmática de IVM observada en las ovejas tratadas con LPS a las 24 y 48 horas post-administración SC, se podrían explicar por los efectos biológicos causados por LPS, el cual activa al TLR 4 presente en células inmunes para así mediar, la traducción de señales que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , IL-6 y la IL-1 (Mobarak *et al.*, 2018), lo que induce la generación de la RFA. Esta RFA es un estado inflamatorio que se caracteriza por la liberación de mediadores químicos entre los que se incluyen aminas vasoactivas como la histamina y serotonina, péptidos (por ejemplo, bradiquinina), y eicosanoides, que son liberados por la activación de las enzimas lipooxigenasa y ciclooxigenasa, generándose productos tales como tromboxano A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2), prostaglandinas E2 (PGE2) y F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) lo que conlleva a la generación de alteraciones metabólicas, hormonales y fisiológicas (Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

Los factores antes mencionados, actúan como mediadores de las disfunciones hemodinámicas que ocurren en la fase inicial de endotoxemia (Danek and Zurek, 2014), lo que generaría una disminución del flujo sanguíneo al tejido subcutáneo retrasando la absorción del fármaco en los animales tratados con LPS. Además, se ha observado que durante la endotoxemia inducida por la administración de LPS en animales se producen una serie de cambios

hemodinámicos entre los más importantes se encuentran la hipovolemia causada por el aumento de la capacidad venosa y la acumulación de sangre venosa, el aumento de la permeabilidad vascular con fuga de líquido hacia el intersticio tisular y la hipotensión (Chvojka *et al.*, 2010). Esta hipotensión sería en último término la responsable del menor flujo sanguíneo al sitio de inyección del fármaco con la consecuente disminución en la tasa de absorción (Danek and Zurek, 2014). Sería recomendable un estudio posterior para determinar los efectos de la RFA inducida por LPS de *E. coli*, sobre la microcirculación a través de Flujiometría por Láser Doppler, este método mide flujo en un volumen variable de tejido (0,5-1 mm<sup>3</sup>) y permite hacer una estimación de la perfusión tisular promedio.



**FIGURA 12:** Concentraciones plasmáticas medias de ivermectina administradas por vía Subcutánea a dosis de 0,2 mg/kg en ovinos control y ovinos tratados con LPS con *E. coli* (n = 5).

\* indica diferencias significativas (P <0,05) con respecto al control.

La TABLA 5 muestra los parámetros farmacocinéticos para ambos grupos de estudio. No se observaron diferencias entre los grupos al comparar los parámetros farmacocinéticos durante las fases de distribución y eliminación de IVM, resultados que se relacionan con la condición corporal que es similar en ambos grupos experimentales (Atta y Abo-Shihada, 2000). Se sabe que la IVM es un fármaco altamente lipofílico (McKellar & Benchaoui, 1996), lo que facilita su deposición en el tejido adiposo lo que representa un importante reservorio del fármaco (Lo *et al.*, 1985), siendo el ovino una especie animal que presenta un gran volumen de distribución como característica farmacocinética propia de la especie (McKellar y Gokbulut, 2012). La baja irrigación que presenta este tejido es responsable de su lenta liberación desde la grasa subcutánea (Atta y Abo-Shihada, 2000) y en este caso responsable de la lenta distribución y eliminación observada tanto en los animales control como en los tratados con LPS de *E. coli*. Además, es conocida la alta potencia antihelmíntica de IVM, siendo un fármaco cuya dosis se expresa en ug/kg, las bajas dosis usadas en este estudio las cuales son las dosis terapéuticas recomendadas comúnmente en condiciones de campo, genera que los parámetros farmacocinéticos se expresen en medidas muy pequeñas del orden de los ng lo cual disminuye las posibilidades de encontrar diferencias en los parámetros farmacocinéticos.

**TABLA 5:** Parámetros farmacocinéticos de ivermectina después de la administración subcutánea de 0,2 mg/kg de peso corporal en ovinos control y tratados con LPS de *E. coli* (n = 5).

Parámetro	Control	LPS	Valor de P
Cmax	30,36 ± 4,9	10,4 ± 2,06	0,01 *
t <sub>1/2</sub> α (días)	0,61 ± 0,15	1,17 ± 0,31	0,19
t <sub>1/2</sub> β (días)	10,2 ± 2,7	5,97 ± 1,57	0,262
ABC <sub>0-t</sub> (ng.día/mL)	143,04 ± 29,38	105,9 ± 14,97	0,34
ABC <sub>0-∞</sub> (ng.día/mL)	211,34 ± 56,02	131,97 ± 15,07	0,256
TMR (días)	12,38 ± 3,77	10,8 ± 1,72	0,74

Cmax: Concentración Máxima, t<sub>1/2</sub> α: Vida media de absorción, t<sub>1/2</sub> β: Vida media de eliminación, TMR: Tiempo medio de Residencia, ABC: Área bajo la curva de la concentración plasmática en el tiempo.

Los valores medios de las concentraciones tisulares de IVM obtenidas en ambos grupos después de la administración subcutánea de una dosis de 0,2 mg IVM/kg se presentan en la TABLA 6. En ambos grupos de ovinos se observó que posterior a la administración SC de 0,2 mg/kg las mayores concentraciones se encontraban en el hígado y el tejido graso, resultados que concuerdan con lo descrito por Nuñez *et al.*, (2007) y por Lespine *et al.*, (2005), sin embargo, las concentraciones fueron muy diferentes a las descritas por estos autores.

Núñez *et al.*, (2007) describe concentraciones de 281,7 ± 117 para el tejido hepático y de 249,0 ± 91 ng/g para el tejido graso a los 1,5 días post administración de IVM, en corderos de 5 meses de edad, mientras Lespine *et al.*, (2005) describen una concentración de 188,34 ± 40,47 ng/g para el tejido hepático y de 132,52 ± 40,84 ng/g para el tejido adiposo a los 2 días post

administración de IVM en cabras de 4 meses de edad, siendo ambas concentraciones muy superiores a las obtenidas en este estudio a los 2 días post administración de IVM para ambos tejidos. Las diferencias observadas se deben al tipo de animal en estudio, ya que nosotros trabajamos con animales adultos, con una condición corporal de 4 y metabólicamente maduros, se sabe que la distribución de IVM es altamente influenciada por la condición corporal así como el estado fisiológico de los animales, y la especie en estudio (McKellar y Gokbulut, 2012), es posible que las menores concentraciones observadas en el presente estudio se deberían a la asociación del fármaco con el tejido adiposo y lipoproteínas circulantes que hacen el fármaco se absorba más lentamente en estas ovejas, además se sabe que IVM es metabolizada en la grasa y en el hígado por lo que se esperaría una mayor concentración en corderos jóvenes donde el sistema metabólico no está completamente desarrollado.

**TABLA 6:** Concentraciones tisulares de ivermectina después de la administración subcutánea de 0,2 mg/kg de peso corporal en ovinos controles y ovinos tratadas con LPS de *E. coli* (n = 5)

Tejido	Control	LPS	Valor de P
Hígado (ng/g)	56,7 ± 15	63,65 ± 6,94	0,67
Bilis (ng/mL)	165,8 ± 15,8	205,2 ± 13,0	0,102
Riñón (ng/g)	22,8 ± 2,7	20,9 ± 2,33	0,61
Musculo (ng/g)	15,1 ± 2,28	15,8 ± 2,42	0,83
Grasa (ng/g)	34,3 ± 6,25	46,3 ± 5,91	0,19
Cerebro (ng/g)	1,16 ± 0,094	1,43 ± 0,25	0,34

En el grupo tratado con LPS, la respuesta inflamatoria aguda inducida por la endotoxina no produjo cambios significativos en las concentraciones de IVM en tejidos en comparación con el grupo de control. Se describe que la IVM tras su administración se distribuye ampliamente por los tejidos, encontrándose las mayores concentraciones en hígado y grasa (Canga *et al.*, 2009), resultados que concuerdan con los observados en este estudio para ambos grupos experimentales de animales.

La ausencia de cambios significativos en las concentraciones tisulares de IVM entre el grupo control y el grupo tratado con LPS de *E. coli*, se debe a las características del fármaco, ya que se sabe que su ruta de distribución transmembrana depende de la difusión simple asociada a su solubilidad lipídica (Lespine *et al.*, 2009), particularmente en este ensayo, debido a la condición corporal de las ovejas, el tejido adiposo actuó como reservorio del fármaco, enmascarando las posibles diferencias generadas en su distribución.

Las bajas concentraciones de fármaco en el cerebro demuestran que la IVM presenta una baja penetración al SNC, debido a que es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Campbell *et al.*, 1983). Esto se debe en parte al gran tamaño molecular de dicho fármaco y a las uniones estrechas en las células endoteliales de los capilares cerebrales (McKellar y Gokbulut, 2012). Se describe que la exclusión completa de IVM en el SNC se explica por la presencia de glicoproteína P (gp-P) en la barrera hematoencefálica (Schinkel *et al.*, 1994) la cual tiene una alta afinidad por la IVM y evitaría que ésta ingrese al SNC (Morgan *et al.*, 2008). El LPS, al desencadenar la RFA, actúa sobre las células de la línea diana estimulando la liberación de citocinas proinflamatorias (Mollen *et al.*, 2006), que son las últimas responsables de modificar la expresión y función de proteínas con función transportadora, como en el caso de gp-P (Aitken *et al.*, 2006).

Estudios anteriores en animales tratados con LPS describen resultados diferentes al presente estudio donde se observó un aumento en las concentraciones cerebrales de colistina (Jin *et al.*, 2011) y florfenicol (Pérez-Fernández *et al.*, 2017). La ausencia de diferencias observables puede explicarse por la elevada potencia antihelmíntica (0,2 mg/kg), el secuestro del fármaco en la grasa corporal y el bajo suministro de sangre a este tejido, lo que reduce la distribución sistémica del fármaco (Atta y Abo-Shihada, 2000).

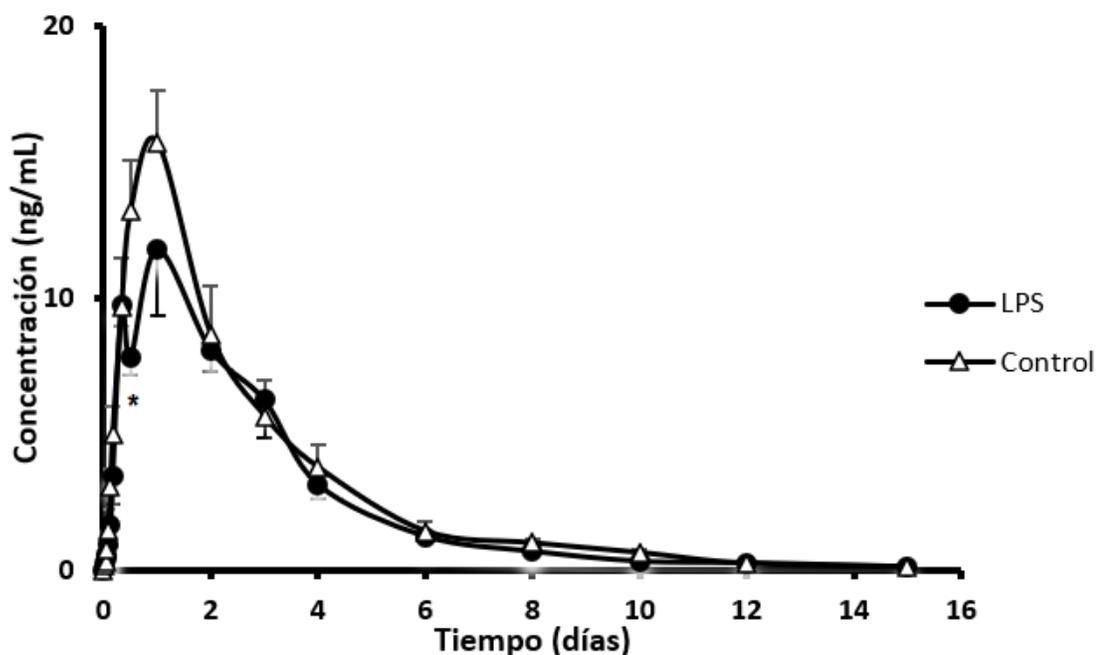
No se observaron diferencias significativas en las concentraciones biliares de IVM entre ambos grupos en estudio. Las bajas concentraciones de IVM encontradas en el tejido renal fueron bajas lo cual se explica por ser IVM un fármaco con escasa distribución al riñón, con una eliminación en la orina que alcanza entre un 0,5 a 2 % (Nuñez *et al.*, 2007).

En resumen, se observaron ciertas diferencias entre ambos grupos de estudio en la fase de absorción de IVM. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en los parámetros farmacocinéticos como en las concentraciones tisulares del fármaco, a pesar de eso es interesante acotar que las concentraciones tisulares obtenidas fueron menores a las de otros estudios esto principalmente debido a la mayor cantidad de grasa de los animales estudiados la que generaría una lenta distribución del fármaco hacia los tejidos blanco.

### **Efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de Ivermectina administrada por vía intraruminal (IR) en ovinos.**

Esta investigación ha estudiado los posibles efectos del RFA inducido por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* sobre perfil farmacocinético de IVM administrada por vía IR en ovinos. Actualmente, se desconocen las consecuencias que tendría la RFA inducida por LPS de *E. coli* sobre la

farmacocinética de IVM en ovinos cuando se utiliza esta vía de administración, por lo que este estudio viene a dar respuesta a dicha interrogante. Se sabe que los rumiantes son animales que presentan un sistema digestivo complejo, en este contexto cualquier bioactivo disuelto en el rumen tenderá a estar en baja concentración (Vandammea and Ellis, 2004). Además, la microflora del rumen puede inactivar algunos fármacos mediante cambios metabólicos o químicos que requieren que se proporcione alguna forma de protección ruminal para un fármaco que está destinado a ser absorbido en la parte inferior del tracto digestivo, o que uno debe confiar en procesos que retrasarán el paso, concentrar o mejorar la absorción del fármaco en sitios más bajos en el intestino (Vandammea and Ellis, 2004), sin embargo, es bien sabido que IVM presenta un bajo metabolismo excretándose mayoritariamente como fármaco inalterado. A pesar de la menor biodisponibilidad de esta ruta con respecto a la vía Subcutánea se han reportado algunas ventajas tanto en la concentración en tejidos diana donde se ubican los parásitos como en el control de determinadas parasitosis gastrointestinales (Egerton *et al.*, 1985)



**FIGURA 13:** Concentraciones plasmáticas medias de ivermectina administradas por vía intraruminal a dosis de 0,2 mg/kg en ovinos controles y en ovinos tratados con LPS con *E. coli* (n = 5)

\* indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto al control.

En la FIGURA 13 se muestran la concentración plasmática (promedio  $\pm$  SEM) de IVM administrada por vía IR en animales de control y tratados con LPS respectivamente. Similar a lo observado en los ovinos tratados con IVM por vía SC, la vía IR generó diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de IVM. Esta diferencia se produjo a las 12 horas post administración del fármaco, con un valor de  $P = 0,035$  lo que indica que existen diferencias en la fase de absorción de IVM entre ambos grupos de estudio.

La TABLA 7 muestra los parámetros farmacocinéticos de IVM posterior a la administración por vía IR, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio.

**TABLA 7:** Parámetros farmacocinéticos de ivermectina después de la administración intraruminal de 0,2 mg/kg de peso corporal en ovinos control y tratados con LPS de *E. coli* (n = 5).

Parámetro	Control	LPS	Valor de P
Cmax ng/mL	15,7 ± 1,92	11,8 ± 2,45	0,25
t 1/2 α (días)	0,56 ± 0,27	0,36 ± 0,07	0,53
t 1/2 β (días)	2,38 ± 0,38	5,69 ± 2,63	0,298
ABC 0-t (ng.día/mL)	45,33 ± 7,21	37,88 ± 3,91	0,44
ABC 0-∞ (ng.día/mL)	45,96 ± 7,58	39,98 ± 4,03	0,55
TMR (días)	2,87 ± 0,22	4,5 ± 1,54	0,85

Cmax: Concentración Máxima, t $\frac{1}{2}$  α: Vida media de absorción, t $\frac{1}{2}$  β: Vida media de eliminación, TMR: Tiempo medio de Residencia, ABC: Area bajo la curva de la concentración plasmática en el tiempo

La Cmáx obtenida en el presente estudio fue 15,7 ± 1,9 ng/mL superior a la obtenida por Mestorino *et al.*, (2003) 11,28 ± 7,43 ng/mL en una formulación de solución administrada por vía oral, esto puede deberse al mayor peso corporal de los animales usados ya que eran ovinos machos de alrededor de 60 Kg, lo cual generaría una mayor asociación al tejido adiposo y fue menor que los calculados por Marriner *et al.*, (1987) (Cmax: 22 ng/mL) y por Prichard *et al.*, (1985) (Cmáx: 17,6 ng/ml) después de la administración de IVM por vía intraruminal a la misma dosis, estas diferencias se deberían a la forma farmacéutica y al vehículo de IVM usada en cada uno de los estudios, en este caso usamos una solución inyectable, la cual se administró directamente al rumen.

En cuanto a la vida media de absorción esta fue de 0,56 ± 0,27 días, superior a la encontrada por Mestorino *et al.*, (2003) para una solución oral (0,43

$\pm 0,21$  días) e inferior a la encontrada luego de administración de tabletas orales ( $0,83 \pm 0,60$  días), tales diferencias se pueden atribuir a la condición corporal diferente de los animales de estudio, así como a la forma farmacéutica del antiparasitario.

En cuanto al ABC ( $45,33 \pm 7,21$  ng día/mL), esta fue muy similar a la obtenida por Mestorino *et al.*, (2003) (ABC:  $44,72 \pm 30,67$  día/mL) y superior a lo informado por Gogolewski *et al.*, (1995) ( $12,2$  ng días/mL) para ovejas tratadas con IVM en una formulación de solución a la misma dosis. Las diferencias en el período de muestreo puede ser el factor más importante, ya que, Gogolewski *et al.*, (1995) solo recogió muestras hasta 5 días post-administración. Marriner *et al.*, (1987) informó, un ABC de  $85$  ng días/mL, el doble del valor observado en el presente estudio.

El TMR fue de  $2,87 \pm 0,22$  días y se correlacionó bien con la semivida de eliminación de  $2,38 \pm 0,38$  días, este valor es similar al reportado por Marriner *et al.*, (1987) con una vida media de eliminación de  $2,55$  días y es menor al descrito por Mestorino *et al.*, (2003) ( $3,63$  días), y por Prichard *et al.*, (1985) ( $4,25$  días). La menor persistencia en IVM en nuestro estudio sería debido al tipo de animal en estudio, ya que son animales jóvenes con bajo depósito de tejido graso, por lo que se produciría una rápida absorción y distribución del fármaco a nivel sistémico.

La menor absorción observada en el grupo tratado con LPS, se debería al efecto generado por la endotoxina sobre la musculatura lisa digestiva que reduce la motilidad gastrointestinal. Se ha demostrado que la administración de LPS asociados al aumento en la temperatura corporal por la liberación de pirógenos endógenos generan una disminución de la amplitud de las contracciones ruminales con una inhibición máxima de la motilidad después de 45 a 150 minutos del inicio de la injuria (Van Miert and Van Duin, 1974). La disminución motilidad gastrointestinal generada sería la causante del lento paso del fármaco desde el

rumen hacia el intestino con el consecuente retraso en la absorción intestinal (Danek and Zurek, 2014) y por lo tanto la menor concentración observada en el grupo tratado con LPS respecto al grupo control. Además, las alteraciones hemodinámicas generadas durante la RFA, también ayudarían a explicar las diferencias encontradas entre los grupos de estudios, puesto que la hipotensión generada por la RIA disminuye el riego sanguíneo de la zona de absorción intestinal y determina por lo tanto una menor absorción del fármaco (Chvojka *et al.*, 2010).

En cuanto a los resultados obtenidos para los parámetros farmacocinéticos de IVM administrada por vía IR en los ovinos control, estos son similares a los obtenidos por Prichard *et al.*, (1985) quien encontró una biodisponibilidad de 25% en ovejas merino, algo menor a la encontrada en este estudio, esta variabilidad puede deberse a las diferencias en raza y composición corporal entre los animales estudiados, en cuanto a la Cmax esta fue de 17,6 muy similar a la encontrada en este estudio.

Diversos autores han documentado el efecto antiinflamatorio e inmunomodulador de la IVM, lo que provocaría una disminución en la liberación de citoquinas proinflamatorias y con ello una supresión del estado inflamatorio general causado por el LPS de *E. coli*, (Zhang *et al.*, 2008; Ventre *et al.*, 2016), este efecto se debe a un bloqueo en la translocación de NF-kB inducido por LPS, lo que impediría la codificación de las citoquinas mencionadas anteriormente y con ello una atenuación del estado inflamatorio general (Zhang *et al.*, 2008), estos antecedentes permiten postular que la ausencia de efectos observados sobre la farmacocinética de IVM en las fases de distribución y eliminación se podrían atribuir al efecto antiinflamatorio e inmunomodulador de este antiparasitario (Zhang *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2011; Ventre *et al.*, 2017; Sia *et al.*, 2020).

En resumen, se observaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas durante la fase de absorción del fármaco luego de

su administración por vía intraruminal, este efecto sería generado por el estado inflamatorio inducido por la administración de LPS. La ausencia de diferencias significativas en las etapas de distribución y eliminación en las concentraciones plasmáticas y parámetros farmacocinéticos se debería a la elevada potencia del fármaco que permite administrar bajas dosis terapéuticas, al efecto de acumulación de fármaco en el tejido adiposo y a un probable efecto antiinflamatorio del fármaco. Se concluye que la RFA inducida por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* en ovinos adultos, no produjo cambios en los parámetros farmacocinéticos de IVM cuando esta se administra por vía IV, SC e IR, ni en la distribución tisular de IVM cuando se administra por vía SC, por lo que su administración en dosis terapéuticas es segura en ovinos que cursen un cuadro inflamatorio derivado de un proceso infeccioso.

## VI. CONCLUSIONES

1. La administración de dosis repetidas de 1 µg/kg de LPS de *E. coli* en ovejas indujo una RFA con cambios significativos en las variables fisiológicas, lo que resultó en aumentos en T°C, FR, FC en los animales tratados. Además, el recuento total y diferencial de leucocitos disminuyó significativamente en las primeras 8 h de la inyección de LPS, seguido de leucocitosis a las 12 y 24h. Los cambios observados permiten caracterizar la respuesta aguda a la infección por microorganismos Gram negativos, principalmente *E. coli*.
2. La RFA inducida por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* en ovinos no produjo cambios significativos en las concentraciones plasmáticas ni en las variables farmacocinéticas de IVM posterior a la administración por vía IV.
3. La RFA inducida por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* en ovejas produjo cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de IVM, durante la fase de absorción del fármaco, cuando se administró en dosis terapéuticas por vía subcutánea en ovinos.
4. La RFA inducida por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* en ovejas no produjo cambios en las concentraciones tisulares de IVM, cuando se administra por vía subcutánea a dosis terapéuticas en ovejas adultas.
5. La RFA inducida por la administración intravenosa de LPS de *E. coli* en ovejas produjo cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de IVM, durante la fase de absorción del fármaco, cuando se administró en dosis terapéuticas por vía Intraruminal en ovinos.
6. La administración de dosis repetidas de 1 µg/kg de LPS de *E. coli* es bien tolerado y no genera daños en los animales de estudio, y permite establecer un

modelo de infección reproducible que es útil para estudiar los efectos de la RFA sobre la farmacocinética de un antihelmíntico como ivermectina.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world*, 11(5), 627.

Aitken, A. E., Richardson, T. A., & Morgan, E. T. (2006). Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 123-149.

Ali, D. N., & Hennessy, D. R. (1996). The effect of level of feed intake on the pharmacokinetic disposition and efficacy of ivermectin in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19(2), 89-94.

Altenburg, S. P., Ventura, D. G., Da-Silva, V. A., Malheiros, L. R., Castro-Faria-Neto, H. C., & Teixeira, N. A. (2002). The role of forced swim test on neutrophil leukocytosis observed during inflammation induced by LPS in rodents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26(5), 891-895.

Alvarez, L., Lifschitz, A., Entrocasso, C., Manazza, J., Mottier, L., Borda, B., ... & Lanusse, C. (2008). Evaluation of the interaction between ivermectin and albendazole following their combined use in lambs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 31(3), 230-239.

Alvinerie, M., Sutra, J. F., Badri, M., & Galtier, P. (1995). Determination of moxidectin in plasma by high-performance liquid chromatography with automated solid-phase extraction and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 674(1), 119-124.

Alvinerie, M., Dupuy, J., Eeckhoutte, C., & Sutra, J. F. (1999). Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. *Parasitology research*, 85(11), 920-922.

- Alvinerie, M., Dupuy, J., Kiki-Mvouaka, S., Sutra, J. F., & Lespine, A. (2008). Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. *Veterinary parasitology*, 157(1), 117-122.
- Andus, T., Bauer, J., & Gerok, W. (1991). Effects of cytokines on the liver. *Hepatology*, 13(2), 364-375.
- Atta, A. H., & Abo-Shihada, M. N. (2000). Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in sheep. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 23(1), 49-52.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., & Lanusse, C. (2007). Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 30(3), 242-248.
- Bannerman, D. D., Paape, M. J., Hare, W. R., & Sohn, E. J. (2003). Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *Journal of dairy science*, 86(10), 3128-3137.
- Beigneux, A. P., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C., & Feingold, K. R. (2002). Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(1), 145-149.
- Bermejo, A., & Duarte, J. (2003). Mecanismos de transducción del lipopolisacárido. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 44(2), 121-139.
- Beutler, B., & Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*, 3(2), 169-176.

Bieniek, K., Szuster-Ciesielska, A., Kamińska, T., Kondracki, M., Witek, M., & Kandefer-Szerszeń, M. (1998). Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after repeated injection of low doses of lipopolysaccharide. *Veterinary immunology and immunopathology*, 62(4), 297-307.

Blackwell, T. S. (2000). impact of basic research on tomorrow's medicine. *CHEST*, 117, 1433.

Blatteis, C. M. (2003). Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? *Journal of Thermal Biology*, 28(1), 1-13.

Blatteis, C. M., Li, S., Li, Z., Feleder, C., & Perlik, V. (2005). Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 76(1-4), 1-18.

Blatteis, C. M. (2006). Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacology & therapeutics*, 111(1), 194-223.

Blatteis, C. M. (2007). The onset of fever: new insights into its mechanism. *Progress in brain research*, 162, 3-14.

Bogan, T. L. J., & McKellar, Q. A. (1988). The pharmacodynamics of ivermectin in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 11(3), 260-268.

Boulant, J. A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clinical infectious diseases*, 31(Supplement 5), S157-S161.

Braun, J. P., Trumel, C., & Bézille, P. (2010). Clinical biochemistry in sheep: A selected review. *Small Ruminant Research*, 92(1), 10-18.

- Brodsky, I. E., & Medzhitov, R. (2009). Targeting of immune signalling networks by bacterial pathogens. *Nature cell biology*, 11(5), 521-526.
- Brownlee, D. J. A., Holden-Dye, L., & Walker, R. J. (1997). Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology*, 115(05), 553-561.
- Buer, J., & Balling, R. (2003). Mice, microbes and models of infection. *Nature Reviews Genetics*, 4(3), 195-205.
- Buras, J. A., Holzmann, B., & Sitkovsky, M. (2005). Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery*, 4(10), 854-865.
- Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schonberg, G., & Jacob, T. A. (1983). Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, 221(4613), 823-828.
- Canga, A. G., Prieto, A. M. S., Liébana, M. J. D., Martínez, N. F., Vega, M. S., & Vieitez, J. J. G. (2009). The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal*, 179(1), 25-37.
- Cecilian, F., Giordano, A., & Spagnolo, V. (2002). The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and peptide letters*, 9(3), 211-223.
- Cerón, J. J., Eckersall, P. D., & Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), 85-99.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., & Vercruyse, J. (2014). Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in parasitology*, 30(7), 361-367.

Chvojka, J., Sykora, R., Karvunidis, T., Radej, J., Krouzecky, A., Novak, I., & Matejovic, M. (2010). New developments in septic acute kidney injury. *Physiological Research*, 59(6), 859.

Colditz, I. G. (2003). Metabolic effects of host defence responses during gastrointestinal parasitism in sheep. *Animal Production Science*, 43(12), 1437-1443.

Coop, R. L., & Kyriazakis, I. (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *TRENDS in Parasitology*, 17(7), 325-330.

Cray, C., Zaias, J., & Altman, N. H. (2009). Acute phase response in animals: a review. *Comparative medicine*, 59(6), 517-526.

Dalal, S., & Zhukovsky, D. S. (2006). Pathophysiology and management of fever. *The Journal of supportive oncology*, 4(1), 9-16.

Danek, J., & Zurek, U. (2014). Changes in domestic animals after endotoxin administration a review. *Annals of Animal Science*, 14(3), 479.

Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), 2095-2147.

Dinarello, C. A. (2004). Review: Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *Journal of endotoxin research*, 10(4), 201-222.

Ebersole, J. L., & Cappelli, D. (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology 2000*, 23(1), 19-49.

Eckersall, P. D. (2004). The time is right for acute phase protein assays. *The veterinary journal*, 168(1), 3-5.

Egerton, J. R., Suhayda, D., & Eary, C. H. (1986). Prophylaxis of nematode infections in cattle with an indwelling rumino-reticular ivermectin sustained release bolus. *Veterinary Parasitology*, 22(1-2), 67-75.

Elmas, M., & Uney, K. (2006). Influence of *Escherichia coli* Endotoxin-Induced Endotoxaemia on the Pharmacokinetics of Enrofloxacin after Intravenous Administration in Rabbits. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53(8), 410-414.

Elmas, M., Yazar, E., Uney, K., Er, A., & Traş, B. (2008). Pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine and interactions between both drugs after intravenous co-administration in healthy and endotoxaemic rabbits. *The Veterinary Journal*, 177(3), 418-424.

Eng, J. (2003). Sample size estimation: how many individuals should be studied? 1. *Radiology*, 227(2), 309-313.

Fardel, O., Lecreur, V., & Guillouzo, A. (1996). The P-glycoprotein multidrug transporter. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(8), 1283-1291.

Farrier, D. S. (1997). PK solutions. Non Compartmental pharmacokinetics data analysis. User guide. Summit Research Services. Ashland, Oh.

Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (2000). *Textbook of Shalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA,

Fernandez, C., Buyse, M., German-Fattal, M., & Gimenez, F. (2004). Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* (3), 359-71.

Fisher, M. H., H. Mrozik. 1989. Chemistry. pp: 1-23. En: W.C. Campbell (Ed.) *Ivermectin and Abamectin* (9th. ed.) Springer - Verlag. New York, U.S.A.

Fitzpatrick, J.L. (2013) Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists. *Veterinary Parasitology*, 195, 233–248.

Foteinou, P. T., Calvano, S. E., Lowry, S. F., & Androulakis, I. P. (2011). A physiological model for autonomic heart rate regulation in human endotoxemia. *Shock (Augusta, Ga.)*, 35(3), 229.

Fox, M. T. (1997). Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology*, 72(3-4), 285-308.

Fox, M. T., Reynolds, G. W., Scott, I., Simcock, D. C., & Simpson, H. V. (2006). Vagal and splanchnic afferent nerves are not essential for anorexia associated with abomasal parasitism in sheep. *Veterinary parasitology*, 135(3), 287-295.

Geyer, J., Gavrilova, O., & Petzinger, E. (2009). Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a, b* P-glycoprotein-and *bcrp*-deficient knockout mice. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(1), 87-96.

Gholami, M., Mazaheri, P., Mohamadi, A., Dehpour, T., Safari, F., Hajizadeh, S., ... & Mani, A. R. (2012). Endotoxemia is associated with partial uncoupling of cardiac pacemaker from cholinergic neural control in rats. *Shock*, 37(2), 219-227.

Gogolewski, R. P., Allerton, G. R., Langhoff, W. K., Cramer, L. G., & Eagleson, J. S. (1995). An ivermectin tablet for sheep: Efficacy against gastro-intestinal nematodes and a bioavailability comparison with a liquid ivermectin formulation. *Veterinary parasitology*, 60(3-4), 297-302.

Gokbulut, C., Cirak, V. Y., Senlik, B., Aksit, D., Durmaz, M., & McKellar, Q. A. (2010). Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses. *Veterinary parasitology*, 170(1), 120-126.

Gomes, A. P., Miguel, P. S. B., Alves, D. L. S., Inoue, V. H., de Paiva Oliveira, A., Cerqueira, F. R., ... & Siqueira-Batista, R. (2016). Pro-inflammatory cytokines in sepsis: biological studies and prospects from in silico research. *Biological Systems: Open Access*, 1-7.

Goralski, K. B., Hartmann, G., Piquette-Miller, M., & Renton, K. W. (2003). Downregulation of *mdr1a* expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin. *British journal of pharmacology*, 139(1), 35-48.

Grencis, R. K. (2015). Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. *Annual review of immunology*, 33, 201-225.

Gridley, D. S., Miller, G. M., & Pecaut, M. J. (2007). Radiation and primary response to lipopolysaccharide: bone marrow-derived cells and susceptible organs. *in vivo*. 21(3), 453-461.

Groothuis, D. G., Gogh, H. V., & Miert, A. V. (1980). The effect of *E. coli* endotoxin induced fever on the bloodlevels of antimicrobial drugs after intravenous and intramuscular administration in veal calves. In *Trends in veterinary pharmacology and toxicology. Proceedings of the first European congress, Zeist, September 1979.* (pp. 77-86). Elsevier.

Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A., & Koopmans, S. J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 6(11), 1045-1056.

Hartz, A. M., Bauer, B., Fricker, G., & Miller, D. S. (2006). Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide. *Molecular pharmacology*, 69(2), 462-470.

Hennessy, D. R., & Alvinerie, M. R. (2002). Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. In: *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*, 97-124.

Hennessy, M., & Spiers, J. P. (2007). A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological research*, 55(1), 1-15.

Heinrich, P. C., Castell, J. V., & Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical journal*, 265(3), 621.

Heumann, D., Glauser, M. P., & Calandra, T. (1998). Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. *Current opinion in microbiology*, 1(1), 49-55.

Hopkins, S. J. (2007). Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration. *Acta Biomedica*, 78(Suppl 1), 231-247.

Houdijk, J. G., Kyriazakis, I., Kidane, A., & Athanasiadou, S. (2012). Manipulating small ruminant parasite epidemiology through the combination of nutritional strategies. *Veterinary parasitology*, 186(1), 38-50.

Huang, W. T., Niu, K. C., Chang, C. K., Lin, M. T., & Chang, C. P. (2008). Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. *European journal of pharmacology*, 593(1-3), 105-111.

Ibrahim, Z. A., Armour, C. L., Phipps, S., & Sukkar, M. B. (2013). RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours?. *Molecular immunology*, 56(4), 739-744.

Ingale, S. L., Mulik, S. V., Suryawanshi, A., & Zadbuke, S. (2010). Nutrition-Parasite Interaction-A Review. *Agricultural Reviews*, 31(1), 48-55.

Jacobsen, S., Toelboell, T., & Andersen, P. H. (2005). Dose dependency and individual variability in selected clinical, haematological and blood biochemical

responses after systemic lipopolysaccharide challenge in cattle. *Veterinary research*, 36(2), 167-178.

Jin, L., Li, J., Nation, R. L., & Nicolazzo, J. A. (2011). Impact of p-glycoprotein inhibition and lipopolysaccharide administration on blood-brain barrier transport of colistin in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(2), 502-507.

Jolles, A. E., Beechler, B. R., & Dolan, B. P. (2015). Beyond mice and men: environmental change, immunity and infections in wild ungulates. *Parasite immunology*, 37(5), 255-266.

Jones, K. L., Brauman, J. N., Groome, N. P., de Kretser, D. M., & Phillips, D. J. (2000). Activin A release into the circulation is an early event in systemic inflammation and precedes the release of follistatin. *Endocrinology*, 141(5), 1905-1908

Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(1), 152-162.

Kabaroff, L. C., Rodriguez, A., Quinton, M., Boermans, H., & Karrow, N. A. (2006). Assessment of the ovine acute phase response and hepatic gene expression in response to *Escherichia coli* endotoxin. *Veterinary immunology and immunopathology*, 113(1), 113-124.

Karrow, N. A. (2006). Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine–immune axis during fetal and neonatal development: Lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. *Brain, behavior, and Immunity*, 20(2), 144-158.

Kato, R., Fujiwara, A., Kawai, T., Moriguchi, J., Nakagawa, M., Tsukura, Y., ... & Tanaka, K. (2008). Changes in digoxin pharmacokinetics treated with

lipopolysaccharide in Wistar rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(6), 1221-1225.

Kiki-Mvouaka, S., Ménez, C., Borin, C., Lyazhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J., ... & Lespine, A. (2010). Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug metabolism and disposition*, 38(4), 573-580.

Krysko, D. V., Agostinis, P., Krysko, O., Garg, A. D., Bachert, C., Lambrecht, B. N., & Vandenabeele, P. (2011). Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends in immunology*, 32(4), 157-164.

Kumar, R., & Malik, J. K. (2003). Influence of endotoxin on the disposition kinetics and dosage regimens of oxytetracycline in calves. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 26(3), 159-164.

Kushner, I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389(1), 39-48.

Laffont, C. M., Toutain, P. L., Alvinerie, M., & Bousquet-Mélou, A. (2002). Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug metabolism and disposition*, 30(6), 626-630.

Laflamme, N., & Rivest, S. (2001). Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *The FASEB Journal*, 15(1), 155-163.

Lanusse, C. E. (1994). Factores que afectan la biodisponibilidad plasmática y eficacia de fármacos antihelmínticos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 26(1), 5-14.

Lanusse, C. E., Virkel, G., Lifschitz, A., & Ballent, M. (2005). Implicancias fisiofarmacológicas de la glicoproteína-P en animales domésticos. *Analecta veterinaria*, 25.

Lespine, A., Alvinerie, M., Sutra, J. F., Pors, I., & Chartier, C. (2005). Influence of the route of administration on efficacy and tissue distribution of ivermectin in goat. *Veterinary parasitology*, 128(3), 251-260.

Lespine, A., Dupuy, J., Alvinerie, M., Coméra, C., Nagy, T., Krajcsi, P., & Orlowski, S. (2009). Interaction of macrocyclic lactones with the multidrug transporters: the bases of the pharmacokinetics of lipid-like drugs. *Current drug metabolism*, 10(3), 272-288.

Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C., & Prichard, R. K. (2012). P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 58-75.

Lespine, A. (2013). Lipid-like properties and pharmacology of the anthelmintic macrocyclic lactones. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 9(12), 1581-1595.

Li, R. W., Li, W., Sun, J., Yu, P., Baldwin, R. L., & Urban, J. F. (2016). The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.

Lin, J. H., & Yamazaki, M. (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics. *Clinical pharmacokinetics*, 42(1), 59-98.

Lifschitz, A., Ballent, M., Virkel, G., Sallovitz, J., & Lanusse, C. (2006). Sex-related differences in the gastrointestinal disposition of ivermectin in the rat: P-glycoprotein involvement and itraconazole modulation. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 58(8), 1055-1062.

Lifschitz, A., Entrocasso, C., Alvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, J., ... Lanusse, C. (2009). P-glycoprotein modulation modifies ivermectin pharmacokinetics and its efficacy against resistant nematodes in lambs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32, 74.

Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Ballent, M., Mate, L., completar Lifschitz, A. (2013). Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3, 20-27.

Lo, P. K. A., Fink, D. W., Williams, J. B., & Blodinger, J. (1985). Pharmacokinetic studies of ivermectin: effects of formulation. *Veterinary research communications*, 9(1), 251-268.

Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145-151.

Maichomo, M. W., Kagira, J. M., & Walker, T. (2004). The point prevalence of gastro-intestinal parasites in calves, sheep and goats in Magadi division, south-western Kenya. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 71(4), 257-261.

Marca, M. C., Gómez-Quintero, A., Viñuales, C., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2009). Changes in plasma hormone levels following lipopolysaccharide injection in rabbits. *The Veterinary Journal*, 180(2), 213-220.

Marriner, S. E., McKinnon, I., & Bogan, J. A. (1987). The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10(2), 175-179.

Martin, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, 154(1), 11-34.

Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Parra, M. D., & Cerón, J. J. (2001). Acute phase proteins: general concepts and main clinical applications in veterinary medicine. In *Anales de Veterinaria de Murcia*. 17, 99-116.

Matheny, C. J., Lamb, M. W., Brouwer, K. L., & Pollack, G. M. (2001). Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 21(7), 778-796.

McKellar, Q. A. (1993). Interactions of *Ostertagia* species with their bovine and ovine hosts. *International journal for parasitology*, 23(4), 451-462.

McKellar, Q. A., & Benchaoui, H. A. (1996). Avermectins and milbemycins. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(5), 331-351.

McKellar, Q., & Gokbulut, C. (2012). Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6), 888-911.

Mestorino, N., Turic, E., Pesa, J., Echeverría, J., & Errecalde, J. O. (2003). Pharmacokinetics in plasma of ivermectin after its oral (solution and tablets) administration to sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26(4), 307-309.

Mizuno, N., & Sugiyama, Y. (2002). Drug transporters: their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 17(2), 93-108.

Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y., & Sugiyama, Y. (2003). Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacological reviews*, 55(3), 425-461.

- Molento, M. B., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Lanusse, C., & Prichard, R. (2004). Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitology Research*, 92(2), 121-127.
- Mollen, K. P., Anand, R. J., Tsung, A., Prince, J. M., Levy, R. M., & Billiar, T. R. (2006). Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*, 26(5), 430-437.
- Mobarak, E., Håversen, L., Manna, M., Rutberg, M., Levin, M., Perkins, R., ... & Borén, J. (2018). Glucosylceramide modifies the LPS-induced inflammatory response in macrophages and the orientation of the LPS/TLR4 complex in silico. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- Moreau, E., & Chauvin, A. (2010). Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *BioMed Research International*, 2010.
- Morgan, E. T., Goralski, K. B., Piquette-Miller, M., Renton, K. W., Robertson, G. R., Chaluvadi, M. R., ... & Richardson, T. A. (2008). Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(2), 205-216.
- Moses, V. S., & Bertone, A. L. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 18(1), 21-37.
- Murata, H., Shimada, N., & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168(1), 28-40.
- Murphy, A. W., McDonald, R., & Ramsay, M. (1995). A comparison of production responses in lambs drenched with moxidectin or ivermectin.
- Myers, M. J., Farrell, D. E., Baker, J. D., Cope, C. V., Evoke-Clover, C. M., & Steele, N. C. (1999). Challenge differentially affects cytokine production and

metabolic status of growing and finishing swine. *Domestic Animal Endocrinology*, 17(4), 345-360.

Myers, M. J., Howard, K. D., & Kawalek, J. C. (2021). Pharmacokinetic comparison of six anthelmintics in sheep, goats, and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44(1), 58-67.

Nagai, Y., Garrett, K. P., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., ... & Kincade, P. W. (2006). Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 24(6), 801-812.

Núñez, M. J., Palma, C., Araneda, M., Cabezas, I., & Perez, R. (2007). Validation of an analytical method and determination of ivermectin residues in sheep tissues. *Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias*, 17(6), 557-565.

Ogoina, D. (2011). Fever, fever patterns and diseases called 'fever'—a review. *Journal of infection and public health*, 4(3), 108-124.

Ōmura, S., & Crump, A. (2004). The life and times of ivermectin—a success story. *Nature reviews microbiology*, 2(12), 984-989.

O'Neill, L. A., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 353-364.

Ott, M., Fricker, G., & Bauer, B. (2009). Pregnane X receptor (PXR) regulates P-glycoprotein at the blood-brain barrier: functional similarities between pig and human PXR. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(1), 141-149.

Pacheco-López, G., Niemi, M. B., Engler, H., Engler, A., Riether, C., Doenlen, R., ... & Schedlowski, M. (2008). Weaken taste-LPS association during endotoxin tolerance. *Physiology & behavior*, 93(1-2), 261-266.

Paltrinieri, S. (2008). The feline acute phase reaction. *The Veterinary Journal*, 177(1), 26-35.

Pandey, S., & Agrawal, D. K. (2006). Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunology and cell biology*, 84(4), 333-341.

Peatman, E., Baoprasertkul, P., Terhune, J., Xu, P., Nandi, S., Kucuktas, H., ... & Liu, Z. (2007). Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(11), 1183-1196.

Peñailillo, A. K., Sepulveda, M. A., Palma, C. J., Espinoza, A., Aguilera, M., Burgos, R. A., ... & Pérez, R. (2016). Haematological and blood biochemical changes induced by the administration of low doses of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in rabbits. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 48(3), 315-320.

Pérez, R., Palma, C., Cabezas, I., Araneda, M., Rubilar, L., & Alvinerie, M. (2006). Effect of parasitism on the pharmacokinetic disposition of ivermectin in lambs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53(1), 43-48.

Pérez, R., Palma, C., Drápela, C., Sepulveda, M., Espinoza, A., & Peñailillo, A. K. (2015). Pharmacokinetics of florfenicol after intravenous administration in *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced endotoxaemic sheep. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 38(2), 144-149.

Pérez, R., Palma, C., Burgos, R., Jeldres, J. A., Espinoza, A., & Peñailillo, A. K. (2016). The acute phase response induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide modifies the pharmacokinetics and metabolism of florfenicol in rabbits. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 39(2), 183-190.

Pérez-Fernández, R., Cazanga, V., Jeldres, J. A., Silva, P. P., Riquelme, J., Quiroz, F., ... & Burgos, R. A. (2017). Plasma and tissue disposition of florfenicol

in *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced endotoxaemic sheep. *Xenobiotica*, 47(5), 408-415.

Petersen, H. H., Nielsen, J. P., & Heegaard, P. M. H. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary research*, 35(2), 163-187.

Plessers, E., Wyns, H., Watteyn, A., Pardon, B., De Backer, P., & Croubels, S. (2015). Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase response. *Veterinary immunology and immunopathology*, 163(1), 46-56.

Pluchino, K. M., Esposito, D., Moen, J. K., Hall, M. D., Madigan, J. P., Shukla, S., ... & Ambudkar, S. V. (2015). Identification of a Cryptic Bacterial Promoter in Mouse (*mdr1a*) P-Glycoprotein cDNA. *PloS one*, 10(8), e0136396.

Post, L. O., Farrell, D. E., Cope, C. V., Baker, J. D., & Myers, M. J. (2003). The effect of endotoxin and dexamethasone on enrofloxacin pharmacokinetic parameters in swine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(2), 889-895.

Prajitha, N., Athira, S. S., & Mohanan, P. V. (2018). Pyrogens, a polypeptide produces fever by metabolic changes in hypothalamus: mechanisms and detections. *Immunology letters*, 204, 38-46.

Prichard, R. K., Steel, J. W., Lacey, E., & Hennessy, D. R. (1985). Pharmacokinetics of ivermectin in sheep following intravenous, intra-abomasal or intraruminal administration. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8(1), 88-94.

Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71, 635.

Ramachandran, G. (2014). Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence*, 5(1), 213-218.

Ramírez, J. Efecto del flunixin meglumina sobre la farmacocinética del florfenico en ovinos con fiebre inducida por lipopolisacárido de *Escherichia coli*. Memoria de Título, Médico Veterinario. 2011. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias. Chillán, Chile.

Randall, R. W., & Gibbs, H. C. (1981). Effects of clinical and subclinical gastrointestinal helminthiasis on digestion and energy metabolism in calves. *American journal of veterinary research*, 42(10), 1730-1734.

Rao, G. S., Ramesh, S., Ahmad, A. H., Tripathi, H. C., Sharma, L. D., & Malik, J. K. (2000). Effects of endotoxin-induced fever and probenecid on disposition of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravascular administration of enrofloxacin in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23(6), 365-372.

Renton, K. W. (2004). Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Current drug metabolism*, 5(3), 235-243.

Renton, K. W. (2005). Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 1(4), 629-640.

Reyes-Lagos, J. J., Ledesma-Ramírez, C. I., Hadamitzky, M., Peña-Castillo, M. Á., Echeverría, J. C., Lückemann, L., ... & Pacheco-López, G. (2019). Symbolic analysis of heart rate fluctuations identifies cardiac autonomic modifications during LPS-induced endotoxemia. *Autonomic Neuroscience*, 221, 102577.

Riegelman, S., Loo, J., & Rowland, M. (1968). Concept of a volume of distribution and possible errors in evaluation of this parameter. *Journal of pharmaceutical Sciences*, 57(1), 128-133.

Rietschel, E. T., & Cavaillon, J. M. (2002). Endotoxin and anti-endotoxin the contribution of the schools of Koch and Pasteur: Life, milestone-experiments and concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris). *Journal of endotoxin research*, 8(1), 3-16.

Riviere, J. (1999). *Comparative pharmacokinetics: Principles, techniques and applications* (pp. 148–167). Ames, IA: Iowa State University Press.

Romero Hurtado, S., & Iregui, C. A. (2010). El lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, (19), 37-45.

Rose, M. L., & Semrad, S. D. (1992). Clinical efficacy of tirlazad mesylate for treatment of endotoxemia in neonatal calves. *American journal of veterinary research*, 53(12), 2305-2310

Rosenfeld, Y., & Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1513-1522.

Roth, J., & De Souza, G. E. P. (2001). Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Brazilian journal of medical and biological research*, 34(3), 301-314.

Rubilar, L., González, F., Islas, A., & Briones, M. (2000). Efecto del tratamiento antihelmíntico gastrointestinal en el rendimiento de canales caprinas. *Agrociencia*, 16(1), 55-61.

Rudaya, A. Y., Steiner, A. A., Robbins, J. R., Dragic, A. S., & Romanovsky, A. A. (2005). Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(5), R1244-R1252.

Rummel, C., Barth, S. W., Voss, T., Korte, S., Gerstberger, R., Hübschle, T., & Roth, J. (2005). Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways?. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(2), R340-R347.

Saitoh, T., Kokue, E., & Shimoda, M. (2000). The impact of acute phase response on the plasma clearance of antipyrine, theophylline, phenytoin and nifedipine in rabbits. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 23(3), 153-158.

Scheff, J. D., Mavroudis, P. D., Calvano, S. E., Lowry, S. F., & Androulakis, I. P. (2011). Modeling autonomic regulation of cardiac function and heart rate variability in human endotoxemia. *Physiological genomics*, 43(16), 951-964.

Schinkel, A. H., Smit, J. J. M., van Tellingen, M., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., ... & Borst, P. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77(4), 491-502

Schinkel, A. H. (1997). The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 8, No. 3, pp. 161-170). Academic Press.

Sia, D. K., Mensah, K. B., Opoku-Agyemang, T., Folitse, R. D., & Darko, D. O. (2020). Mechanisms of ivermectin-induced wound healing. *BMC veterinary research*, 16(1), 1-12.

Simcock, D. C., Joblin, K. N., Scott, I., Burgess, D. M., Rogers, C. W., Pomroy, W. E., & Simpson, H. V. (1999). Hypergastrinaemia, abomasal bacterial population densities and pH in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *International journal for parasitology*, 29(7), 1053-1063.

Simpson, H. V., Przemec, S. M. C., Scott, I., & Pernthaner, A. (2009). Effects of *Teladorsagia* (*Ostertagia*) *circumcincta* infection on lambs selected for high fleece weight. *Veterinary parasitology*, 165(3), 256-264.

Smit, J. J. M., Schinkel, A. H., Elferink, R. O., Groen, A. K., Wagenaar, E., Van Deemter, L., ... & Van der Valk, M. A. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75(3), 451-462.

Sun, M., Kingdom, J., Baczyk, D., Lye, S. J., Matthews, S. G., & Gibb, W. (2006). Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the human placenta decreases with advancing gestation. *Placenta*, 27(6), 602-609.

Teng, S., & Piquette-Miller, M. (2005). The involvement of the pregnane X receptor in hepatic gene regulation during inflammation in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 841-848.

Turrin, N. P., & Rivest, S. (2004). Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems. *Experimental Biology and Medicine*, 229(10), 996-1006.

Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., Greenacre, C., ... & Yanong, R. (2013). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition*. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.

Vandamme, T. F., & Ellis, K. J. (2004). Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 56(10), 1415-1436

Van Lieshout, M. H., Florquin, S., van't Veer, C., de Vos, A. F., & van der Poll, T. (2015). TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$  (TRIF) mediates

antibacterial defense during gram-negative pneumonia by inducing Interferon- $\gamma$ . *Journal of innate immunity*, 7(6), 637-646.

Van Miert, A. S. J. P. A. M., & Van Duin, C. T. M. (1974). The effects of bacterial pyrogens and leucocytic pyrogen upon gastric motility and heart rate frequency in conscious goats. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 21(8), 692-702

Van Miert, A. S. J. P. A. M. (1995). Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: Pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Veterinary Quarterly*, 17(2), 41-50.

Van Miert, A. S. J. P. A. M., Van Duin, C. T. M., & Wensing, T. (1997). Effects of pentoxifylline and polymyxin B on the acute-phase-response to *Escherichia coli* endotoxin in dwarf goats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 20(1), 61-68.

Vendrig, J. C., Coffeng, L. E., & Fink-Gremmels, J. (2013). Effects of separate and concomitant TLR-2 and TLR-4 activation in peripheral blood mononuclear cells of newborn and adult horses. *PloS one*, 8(6), e66897.

Ventre, E., Rozières, A., Lenief, V., Albert, F., Rossio, P., Laoubi, L., ... & Vocanson, M. (2017). Topical ivermectin improves allergic skin inflammation. *Allergy*, 72(8), 1212-1221.

Vercruysse, J., & Claerebout, E. (2001). Treatment vs non-treatment of helminth infections in cattle: defining the threshold. *Veterinary parasitology*, 98(1), 195-214.

Von Bernhardt, R. (2004). La barrera hemato-encefálica en la patología del sistema nervioso central: su importancia en la respuesta inflamatoria. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 42(2), 121-130.

- Wang, J. H., Scollard, D. A., Teng, S., Reilly, R. M., & Piquette-Miller, M. (2005). Detection of P-glycoprotein activity in endotoxemic rats by <sup>99m</sup>Tc-sestamibi imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(9), 1537-1545.
- Ward, C. K., & Inzana, T. J. (1994). Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 153(5), 2110-2121.
- Weiss, J., Franson, R. C., Beckerdite, S., Schmeidler, K., & Elsbach, P. (1975). Partial characterization and purification of a rabbit granulocyte factor that increases permeability of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, 55(1), 33.
- Witkamp, R., & Monshouwer, M. (2000). Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Veterinary Quarterly*, 22(1), 11-16.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249(4975), 1431-1433.
- Yan, S., Ci, X., Chen, N. A., Chen, C., Li, X., Chu, X., ... & Deng, X. (2011). Anti-inflammatory effects of ivermectin in mouse model of allergic asthma. *Inflammation Research*, 60(6), 589-596.
- Yates, D. T., Löest, C. A., Ross, T. T., Hallford, D. M., Carter, B. H., & Limesand, S. W. (2011). Effects of bacterial lipopolysaccharide injection on white blood cell counts, hematological variables, and serum glucose, insulin, and cortisol concentrations in ewes fed low-or high-protein diets. *Journal of animal science*, 89(12), 4286-4293.

Yoshioka, M., Watanabe, A., Shimada, N., Murata, H., Yokomizo, Y., & Nakajima, Y. (2002). Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(3), 425-433.

Zhang, X., Song, Y., Ci, X., An, N., Ju, Y., Li, H., ... & Deng, X. (2008). Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice. *Inflammation Research*, 57(11), 524-529