



CONTROL DE LAS TRICOSTRONGILIDOSIS
OVINAS: DISEÑO, SÍNTESIS Y ENSAYOS CLÍNICOS
DE EFICACIA DE NUEVAS MOLÉCULAS DE
ACCIÓN ANTIHELMÍNTICA

Autora

Elora Valderas García

Directores

María Martínez Valladares

Rafael Balaña Fouce

Francisco Antonio Rojo Vázquez

Programa de Doctorado

“Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”

Facultad de Veterinaria

León, 2022

"Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Ahora es el momento de comprender más para temer menos".

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que, de una u otra manera, han hecho posible este trabajo. Es por ello que me gustaría agradecerles en primer lugar a mis directores María, Rafa y Paco, por su tiempo, dedicación y paciencia, sin los cuales este trabajo no hubiera salido adelante. Gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de ello y por toda la confianza depositada durante estos años.

A todos los que forman parte del equipo de Toxicología de la Facultad de Veterinaria. Parte de este trabajo ha sido posible gracias a vosotros. Gracias también a Valentín, por toda la ayuda prestada durante este tiempo.

Al mejor equipo de parasitólogos que se puede tener de compañeros, porque como suelen decir: “solo se llega más rápido, pero juntos más lejos”. A Vero, gracias por cada viaje, cotilleo y carcajada compartida en el despacho. A Maria, sin tilde, por ser compañera de trabajo y de vida, eres luz. A Laura por traer la alegría del sur y a Álvaro por sacarme una sonrisa en los momentos duros.

A todas las personas que forman parte del Instituto de Ganadería de Montaña, en especial a Carmen y María Jesús por guiarme y ayudarme desde el principio, a Fernando por estar siempre dispuesto a escuchar, y a todos los trabajadores de la finca que en algún momento han ayudado en el proceso. A Mariví, gracias por tener siempre una palabra bonita para todos.

A todos con los que empecé el trayecto en el IGM. A Noive, Marcos y Dani, gracias por cada risa compartida en las noches de cortos, viajes y rutas. A Saúl, gracias por los audios a “medianoche” post Riberas y por cada carcajada.

A todos los que fueron llegando en algún momento del trayecto. A Víctor, gracias simplemente por estar siempre y para todo. A mi confidente, Mari Tere, gracias por cada charla y cada tarde en la Nave, ojalá para siempre. Gracias a todos los becarios en general: Antonella, Alba, Gloria, Miguel, Zapico, Esther y Alex. Gracias por los momentos compartidos.

A aquellas con las que además he tenido la suerte compartir mi día a día. María, qué hubiera hecho sin ti, gracias por colorearme los días grises con chocolate y con tu sonrisa, no la pierdas nunca. A Marta, gracias por estar siempre dispuesta a escuchar y ayudar, gracias por las carcajadas, por tus carcajadas. A Raquel, por enseñarme a ver la vida con otros ojos y por hacerme mejor persona. Una parte de mí se queda contigo.

A los que me acogieron en Olomouc haciéndome sentir como en casa, mis vascos, en especial a Oihane, por enseñarme cada rincón.

Gracias también a mis arandinos, a Raquel, Eva y Colla que me han acompañado desde siempre. A mi media pera, Marta, compañera de las mejores batallas, risas y lloros. A mi Sheila, por ser apoyo incondicional, para siempre.

Y como todo proceso, hay personas que se van, pero que han sido piezas fundamentales y que se quedan para siempre dentro de ti. Parte de en lo que me he convertido es por ti, gracias Dani. A Susi y Patri, por todo.

Y lo que el camping unió, que no lo separe nadie. Gracias a todos los de Torre. Mis chicas, Miner, Bea y Selena, juntas desde que recuerdo. Gracias Selena, por ser una hermana, cada vez que te miro me siento un poco más orgullosa.

Y por último y no por ello menos importante, a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano. Nada de lo que soy o lo que tengo lo hubiera conseguido sin vosotros. Sois el mejor ejemplo que se puede seguir. Gracias por apoyarme en todo momento hasta el final sin dudar. No tengo vida suficiente para daros las gracias.

A todas las personas que de alguna manera se han cruzado en este camino, gracias.

PREFACIO

La presente Tesis Doctoral se ha estructurado en cinco Capítulos independientes, que corresponden a los artículos científicos que han sido, o están en fase de publicación, en revistas científicas internacionales indexadas. Cada Capítulo se ha redactado de forma que pueda entenderse de forma independiente al resto de las partes de la Tesis Doctoral. Por lo tanto, cada uno contiene su propio Resumen, Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones. Además, esta Tesis Doctoral incluye una Introducción general, que proporciona información sobre el contexto actual de las infecciones producidas por nematodos gastrointestinales; Discusión general, que evalúa el conjunto de los cinco Capítulos y reflexiona sobre las oportunidades científicas que se abren como consecuencia de los resultados aquí recogidos; Conclusiones, con las conclusiones de cada Capítulo individual y Resumen.

El trabajo recogido en presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la financiación del Ministerio de Universidades, a través del contrato predoctoral (FPU17/00627) concedido (Resolución de 31 de agosto de 2018, de la Secretaría de Estado de Universidades, Investigación, Desarrollo e Innovación, BOE-A-2018-12689) al amparo de la convocatoria “Ayudas para la formación de profesorado universitario (FPU)” para el año 2018.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
ABREVIATURAS EN INGLÉS	15
RESUMEN	17
SUMMARY	21
INTRODUCCIÓN	25
1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL	26
1.1 PRODUCCIÓN GANADERA OVINA EN ESPAÑA	26
2. NEMATODOSIS GASTROINTESTINALES	31
2.1 CICLO BIOLÓGICO DE LOS TRICOSTRONGÍLIDOS.....	33
2.2 EPIDEMIOLOGÍA	35
2.3 FISIOPATOLOGÍA Y SIGNOS CLÍNICOS PRODUCIDOS POR LOS NGI	40
3. CONTROL DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR NEMATODOS GASTROINTESTINALES MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS	43
3.1 BENCIMIDAZOL-CARBAMATOS Y PROBENCIMIDAZOLES.....	43
3.2 LACTONAS MACROCÍCLICAS	45
3.3 IMIDAZOTIAZOLES.....	47
3.4 DERIVADOS DE AMINOACETONITRILLO	48
3.5 ESPIROINDOLES.....	50
3.6 OTROS FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS	51
4. RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA	53
4.1 FACTORES QUE FAVORECEN LA APARICIÓN DE RA.....	54
4.2 MECANISMOS POR LOS QUE SE DESARROLLA LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA Y SU DETECCIÓN A NIVEL MOLECULAR.....	55
4.3 ESTADO ACTUAL DE LA RESISTENCIA.....	59
4.4 USO SOSTENIBLE DE FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS	62
5. BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA	68
5.1 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA ANTIHELMÍNTICA DE COMPUESTOS.	69
5.2 NUEVOS ENSAYOS DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO	77
5.3 ÚLTIMOS AVANCES EN EL DESCUBRIMIENTO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA.....	84
BIBLIOGRAFÍA	90
OBJETIVOS	110

CAPÍTULO I	111
"Teladorsagia circumcincta beta tubulin: the presence of the E198L polymorphism on its own is associated with benzimidazole resistance"	
ABSTRACT	112
INTRODUCTION	113
METHODS	115
RESULTS.....	119
DISCUSSION.....	127
CONCLUSIONS.....	131
REFERENCES	132
SUPPLEMENTAR INFORMATION	134
CAPÍTULO II	135
"Anthelmintic activity of aminoalcohol and diamine derivatives against the gastrointestinal nematode <i>Teladorsagia circumcincta</i>"	
ABSTRACT.....	136
INTRODUCTION	137
MATERIALS AND METHODS	139
RESULTS.....	145
DISCUSSION.....	150
TABLES.....	155
REFERENCES	162
CAPÍTULO III	166
"Novel compound shows <i>in vivo</i> anthelmintic activity in gerbils and sheep infected by <i>Haemonchus contortus</i>"	
ABSTRACT.....	167
INTRODUCTION	168
RESULTS.....	169
DISCUSSION.....	172
MATERIAL AND METHODS	175
REFERENCES	180
CAPÍTULO IV	182
"Benzimidazole and aminoalcohol derivatives show <i>in vitro</i> anthelmintic activity against <i>Trichuris muris</i> and <i>Heligmosomoides polygyrus</i>"	
ABSTRACT.....	183
INTRODUCTION	184
MATERIAL AND METHODS	185
RESULTS.....	188

DISCUSSION.....	190
CONCLUSIONS.....	193
TABLES.....	194
REFERENCES.....	198
CAPÍTULO V.....	201
"Screening for compounds with anthelmintic activity in <i>Heamonchus contortus</i> and <i>Teladorsagia circumcincta</i> using motility measurement"	
ABSTRACT.....	202
INTRODUCTION.....	203
PROTOCOL.....	204
REPRESENTATIVE RESULTS.....	208
MATERIALS AND EQUIPMENT.....	210
DISCUSSION.....	211
REFERENCES.....	215
DISCUSIÓN.....	217
CONCLUSIONS.....	228
BIBLIOGRAFÍA.....	225
ANEXO I.....	228

ABREVIATURAS

ADMET	Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad
AH	Antihelmíntico
AS-PCR	PCR alelo específica
BZ	Bencimidazol
Ca²⁺	Calcio
CCAA	Comunidades Autónomas
CET	Ensayo de eficacia controlada
Cl⁻	Cloro
COBADU	Cooperativa Bajo Duero
DAA	Derivados de aminoacetonitrilo
DB-1	2,1,3-benzotiadiazol
DE₅₀	Dosis eficaz 50
EHT	Ensayo de eclosión de huevos
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FECRT	Prueba de reducción del recuento de huevos en heces
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GluCl_s	Canales de cloruro activados por glutamato
HCl	Ácido clorhídrico
INVAPP	Plataforma de fenotipado automatizado de invertebrados
K⁺	Potasio
L₁	Larva de primer estadio
L₂	Larva de segundo estadio
L₃	Larva de tercer estadio
L₄	Larva de cuarto estadio
L₅	Larva de quinto estadio
LDT	Ensayo de desarrollo larvario

LGIC	Canales iónicos activados por ligandos
LM	Lactona Macrocíclica
LMT	Ensayo de motilidad larvaria
LMIT	Ensayo de inhibición de la migración larvaria
MTS	4,5,dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetaxi-fenil)-2-4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Na²⁺	Sodio
nAChR	Receptor de acetilcolina
NGI	Nematodos gastrointestinales
P-gp	Glicoproteína P
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RFLP	PCR - Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
qPCR	PCR en tiempo real
RA	Resistencia antihelmíntica
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
UE	Unión Europea
WAAVP	Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria.
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

ABREVIATURAS EN INGLÉS

AA	Diamine
ABZ	Albendazole
ADMET	Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity
AH	Anthelmintic
AO	Aminoalcohol
AS-PCR	Allele specific-PCR
BZ	Benzimidazole
CC₅₀	Cytotoxic concentration 50
CET	Controlled efficacy test
CL	Confident limit
CSIRO	Commonwealth Scientific Industrial Research Organization
DD	Discriminant dose
DMSO	Dimethylsulfoxide
ED₅₀	Effective Dose 50
EHT	Egg hatch test
EPG	Eggs per gram
FDA	Food and Drugs Administration
FEC	Faecal egg count
FECRT	Faecal egg count reduction test
GIN	Gastrointestinal nematodes
HDD	Hatching ratio
IVM	Ivermectin
INVAPP	Invertebrate automated phenotyping platform
L₁	First stage larvae
L₂	Second stage larvae
L₃	Third stage larvae
L₄	Fourth stage larvae

LD₅₀	Lethal Dose 50
LDT	Larval development test
LEU	Leucine
LEV	Levamisole
LMIT	Larval migration inhibition test
LMT	Larval motility test
MBZ	Mebendazole
ML	Macrocyclic Lactone
MT-PCR	Multiplexed Tandem PCR
PCR	Polymerase chain reaction
PCR-RFLP	<i>PCR</i> - Restriction Fragment Length Polymorphism
PYR	Pyrantel pamoate
qPCR	Quantitative PCR
SI	Selectivity index
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPSS	Statistical Computer Package for Social Science
TBZ	Thiabendazole
TST	Target selective treatment
WAAVP	World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology
WHO	World Health Organization

RESUMEN

Las infecciones producidas por parásitos helmintos, incluyendo nematodos, trematodos y cestodos, representan una importante causa de enfermedad y pérdida económica para la industria ganadera de pequeños rumiantes a nivel mundial. Dentro de los helmintos, los nematodos gastrointestinales son los más relevantes en términos de impacto sanitario y económico, tanto en países en desarrollo como en industrializados. En pequeños rumiantes, las especies responsables de producir las mayores pérdidas económicas son *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus* spp.

En condiciones de campo, la mayoría de las infecciones suelen ser mixtas, incluyendo diferentes especies de nematodos que se localizan en el abomaso e intestino. Se trata de procesos generalmente endémicos, de curso crónico y mortalidad baja. Sin embargo, el impacto de este tipo de parasitaciones en el animal va a depender no solo de la intensidad de la infección, si no también del estado fisiológico e inmunológico del hospedador. Los signos clínicos que suelen presentarse más comúnmente incluyen anorexia, diarrea, emaciación y anemia. Aunque, en casos de altos niveles de parasitación, sobre todo en animales jóvenes, se puede incluso producir la muerte.

La administración de fármacos antihelmínticos ha sido el tratamiento de elección para el control de estas parasitosis durante muchos años debido a la disponibilidad de fármacos de alta eficacia y seguridad. Sin embargo, el creciente aumento de la prevalencia de la resistencia a los antihelmínticos a nivel mundial hace que los actuales programas de control sean costosos e insostenibles a largo plazo. Además hay que tener en cuenta que el cambio climático está provocando cambios en la incidencia e intensidad de estas infecciones, lo que agrava su impacto económico en la ganadería. Es por ello que la búsqueda de nuevos fármacos con actividad antihelmíntica y nuevos mecanismos de acción es de vital importancia en la actualidad.

Para abordar esta problemática, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral se enfoca en la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antihelmíntica frente a las infecciones ovinas causadas por tricostrongídeos que puedan ayudar a resolver los problemas generados por la aparición de la resistencia.

En este contexto, tres de los cinco capítulos en que se divide la presente Tesis Doctoral se centran en la evaluación de la posible actividad antihelmíntica de varias familias de compuestos sintetizados por el departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca. En primer lugar, los compuestos fueron sometidos a un cribado primario a una dosis de 50 μM para determinar su eficacia *in vitro* frente a distintos estadios parasitarios del nematodo *T. circumcincta*. Los compuestos con una eficacia superior al 90% fueron seleccionados para llevar a cabo estudios con una cepa resistente a los bencimidazoles, ivermectina y levamisol, así como para calcular la dosis eficaz 50 (DE_{50}) de cada uno de ellos.

Paralelamente se llevaron a cabo estudios *in vitro* de citotoxicidad para descartar aquellos más tóxicos. Los tres compuestos con mayor actividad antihelmíntica y menor toxicidad *in vitro* fueron seleccionados con el fin de continuar con los experimentos de toxicidad y eficacia en modelos animales. Dos derivados de diamina y un derivado bencimidazólico fueron los compuestos seleccionados como candidatos, todos ellos con una DE_{50} inferior a 3 μM en alguno de los ensayos llevados cabo. Una vez que se descartaron los posibles efectos adversos de la administración por vía oral de los tres candidatos en ratones, se evaluó su eficacia antihelmíntica utilizando para ello jerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) infectados con *H. contortus*. Tras observar una reducción del 95% en el número de pre-adultos presentes en el estómago de los animales del grupo tratado con el derivado bencimidazólico a una dosis de 200 mg/kg, se decidió probar la eficacia del compuesto en el hospedador definitivo, la oveja.

En el último experimento de esta parte del trabajo se comprobó que el grupo de ovejas tratado con el derivado bencimidazólico a una dosis de 120 mg/kg, produjo una reducción del recuento de huevos en heces del 99% y del 95% en el número de adultos presentes en el abomaso, demostrando ser un candidato interesante para su desarrollo como fármaco antihelmíntico. Es por ello por lo que creemos necesario

continuar realizando más estudios en futuro que permitan establecer una dosis mínima eficaz, así como determinar su eficacia en diferentes especies y cepas de nematodos gastrointestinales, y llevar a cabo estudios detallados de farmacocinética y farmacodinamia.

En este contexto, durante la estancia internacional llevada a cabo en el “Swiss Tropical and Public Health Institute”, en Basilea (Suiza), parte de los compuestos utilizados en el cribado llevado a cabo en el nematodo *T. circumcincta* fueron evaluados en otro modelo de nematodo gastrointestinal que infecta ratones, *Trichuris muris*. De nuevo, tres compuestos fueron seleccionados por su potente actividad frente a larvas de primer estadio en un cribado inicial a una dosis de 100 μM , para posteriormente comprobar su eficacia frente a las formas adultas del parásito. Los tres candidatos consistían en dos derivados bencimidazólicos y un derivado de aminoalcohol, siendo distintos de los seleccionados en el estudio anterior. Adicionalmente, estos candidatos se testaron frente a las formas adultas del nematodo *Heligmosomoides polygyrus*. Como resultado final, dos de ellos mostraron eficacia en alguna de las dos formas adultas de los parásitos; uno de los derivados bencimidazólicos presentó una DE_{50} 8,1 μM frente a *T. muris* y el otro una DE_{50} de 5,3 μM frente a *H. polygyrus*. Es por ello que ambos compuestos podrían ser también potenciales candidatos para llevar a cabo ensayos de eficacia *in vivo* en un futuro utilizando animales infectados.

Con la finalidad de combatir el problema de la falta de nuevos fármacos antihelmínticos, en la presente Tesis Doctoral se ha abordado otro enfoque relacionado con la búsqueda de técnicas de cribado mejoradas que permitan la evaluación de gran cantidad de compuestos en un corto periodo de tiempo. Así, durante la segunda estancia internacional realizada en el “Laboratory of Growth Regulators” de la Universidad de Palacký, en Olomouc (República Checa), se puso a punto un protocolo de cribado de compuestos de alto rendimiento utilizando el dispositivo wMicrotracker ONE, en *T. circumcincta* y *H. contortus*. Este dispositivo es capaz de medir de forma automatizada la movilidad de las distintas formas parasitarias tras la incubación con los compuestos a través de microhaces de luz infrarroja.

Complementariamente, también hemos llevado a cabo estudios sobre el nivel de resistencia de los tricostrongílidos presente en los rebaños de ovino de la Comunidad Autónoma de Castilla y León frente a los fármacos bencimidazólicos mediante técnicas *in vivo*, *in vitro* y moleculares. Nuestro estudio confirmó un aumento de la presencia de resistencia antihelmíntica con respecto a los últimos datos analizados años anteriores, siendo *T. circumcincta* la especie más resistente. En este estudio el 35% de las explotaciones muestreadas resultaron resistentes al netobimín mediante el ensayo *in vivo* de reducción del número de huevos en heces y del 26% mediante el ensayo *in vitro* de eclosión de huevos, encontrándose una correlación muy alta entre ambas técnicas ($r = -0.770$; $p < 0,0001$). A nivel molecular, asociamos la presencia de un nuevo polimorfismo localizado en el codón 198 del gen que codifica para el isotipo 1 de la β -tubulina de *T. circumcincta* (E198L), con el nivel de resistencia de los bencimidazoles. En este sentido, se demostró una correlación muy alta y similar entre la presencia del nuevo polimorfismo y la resistencia medida mediante los ensayos *in vivo* e *in vitro* ($r > 0,720$; $p < 0,0001$).

SUMMARY

Infections caused by helminth parasites, including nematodes, trematodes and cestodes, represent an important cause of disease and economic loss for the small ruminant livestock industry. Within helminths, gastrointestinal nematodes are the most relevant in terms of health and economic impact in both developing and industrialised countries. *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus* spp. are the three species responsible for the highest economic losses worldwide.

Under field conditions, most infections are usually caused by more than one species of nematodes located in the abomasum and intestine. These are generally endemic processes, with chronic course and low mortality. However, the impact of this parasitism depends on the infection intensity, as well on the physiological and immunological state of the host. Most common clinical signs include anorexia, diarrhoea, emaciation and anaemia. However, in cases of high levels of infection, especially in young animals, death can take place.

Administration of anthelmintic drugs has been the treatment of choice for the control of these parasites for many years due to the availability of highly effective and safe drugs. However, the increasing prevalence of anthelmintic resistance worldwide has led to control programmes that are costly and unsustainable in the long term. In addition, climate change is increasing the incidence and intensity of these infections, which exacerbates their economic impact on livestock farming. Therefore, searching for new drugs with anthelmintic activity and new mechanisms of action is vital.

To address this problem, the general objective of the present Thesis is focused on the search for new compounds with potential anthelmintic activity against trichostrongylid infections in sheep which could alleviate the problems arising from the emergence of resistance.

In this context, three out of five chapters described in the present Thesis are focused on the evaluation of the possible anthelmintic activity of several families of compounds synthesized by the Department of Pharmaceutical Chemistry of the University of Salamanca. First, the compounds were subjected to a primary screening at a dose of 50 μM to determine their *in vitro* efficacy against different parasitic stages of the nematode *T. circumcincta*. Those compounds with an efficacy higher than 90% were selected to carry out studies with a triple resistant isolate (to benzimidazoles, ivermectin and levamisole), as well as to calculate their effective dose 50 (ED_{50}).

At the same time, *in vitro* cytotoxicity studies were carried out to discard the most toxic compounds. Therefore, the three compounds with the highest anthelmintic activity and lowest *in vitro* toxicity were selected in order to study their *in vivo* toxicity and efficacy in gerbils and sheep. Two diamine and one benzimidazole derivatives were selected as candidate compounds, all of them with an ED_{50} below 3 μM in one of the tests carried out. Once the potential adverse effects of oral administration of the candidates in mice were discarded, their anthelmintic efficacy was evaluated using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) infected with *H. contortus*. After observing a 95% reduction in the number of pre-adults in the stomach of the gerbils in the group treated with the benzimidazole derivative at a dose of 200 mg/kg, we decided to evaluate the efficacy of the compound in the definitive host, the sheep.

In the last experiment, the group of sheep treated with the benzimidazole derivative at a dose of 120 mg/kg produced a 99% reduction in the number of eggs in faeces 7 days after administration, and a 95% reduction in the number of adults present in the sheep abomasum. Under this context, the BZ derivative demonstrated to be an interesting candidate for the development of an anthelmintic drug. For this reason, we believe it is necessary to carry out further studies to establish a minimum effective dose, as well as to determine its efficacy in different GIN species and isolates, and to carry out detailed pharmacokinetic and pharmacodynamic studies.

In this context, during the international stay at the “Swiss Tropical and Public Health Institute”, in Basel (Switzerland), part of the compounds previously tested in the nematode *T. circumcincta*, were evaluated against another model of GIN infecting mice: *Trichuris muris*. Three compounds were selected for their potent activity against

the first larvae stage in an initial screening at a dose of 100 μM , and subsequently their efficacy against the adult forms of the parasite was tested. The three candidates consisted of two benzimidazole and one aminoalcohol derivatives, being different from those selected in the previous experiment. Additionally, these candidates were tested against adult forms of *Heligmosomoides polygyrus*. As a final result, two of them showed efficacy, at least, against one of the two parasites; one derivative showed an ED_{50} of 8.1 μM against *T. muris* and BZ12 showed an ED_{50} of 5.3 μM against *H. polygyrus*. Therefore, both compounds could also be potential candidates for future *in vivo* efficacy studies using infected animals.

Another approach that we have considered in the present Thesis, in order to combat the problem of the lack of new anthelmintic drugs, is related to the search for improved screening techniques that allow the evaluation of large number of compounds in a short period of time. Thus, during the second international stay at the "Laboratory of Growth Regulators" of the University of Palacký, in Olomouc (Czech Republic), a high-throughput compound screening protocol was set up using the wMicrotracker ONE device on *T. circumcincta* and *H. contortus*. This device is able to automatically measure the mobility of the different parasite stages after their incubation with the compounds by means of infrared light microbeams.

Complementarily, we have also carried out studies to determine the level of benzimidazole resistance of gastrointestinal nematodes present in sheep flocks in Castilla y León by means of *in vivo*, *in vitro* and molecular techniques. Our study confirmed an increase in the occurrence of anthelmintic resistance compared to the last data analysed in previous years, being *T. circumcincta* the most resistant species. In this study, 35% of the sampled farms were resistant to netobimin by the *in vivo* faecal egg reduction test and 26% by the *in vitro* egg hatching test, with a very high correlation between both techniques ($r = -0.770$; $p < 0.0001$). At molecular level, we also observed that a novel polymorphism at codon 198 of the isotype-1 β -tubulin gene can confer BZ resistance on its own in *T. circumcincta*. A very high and similar correlation was demonstrated between the presence of the new polymorphism and resistance measured by *in vivo* and *in vitro* assays ($r > 0.720$; $p < 0.0001$).

INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

La producción de carne y productos lácteos es inevitable para satisfacer la demanda de la creciente población mundial. En los países en desarrollo el sector ganadero se considera la columna vertebral de la economía, siendo los pequeños rumiantes una parte muy importante de esta. La demanda se multiplica a gran velocidad como consecuencia del rápido crecimiento demográfico mundial, así como del aumento del poder adquisitivo de la población y de las oportunidades de exportación. Es por ello que la ganadería es fundamental para la sostenibilidad de las comunidades rurales de todo el mundo ^{1,2}.

Sin embargo, la forma en que los sistemas alimentarios han evolucionado en las últimas décadas ha desencadenado una serie de cambios socioeconómicos y climáticos que acentúan cada vez más la necesidad de centrarse en la seguridad alimentaria, obtenida a partir de una intensificación sostenible de la agricultura. La producción ganadera eficiente es por tanto un punto crucial para lograr este objetivo ³.

En este contexto, el futuro de la ganadería dependerá en gran medida del grado en que esta industria pueda alcanzar niveles de producción óptimos y sostenibles en un entorno medioambiental y socioeconómico cambiante ⁴.

El censo total de la ganadería de rumiantes dentro de la Unión Europea (UE), incluyendo bovinos, ovinos y caprinos; se situó en casi 152 millones de cabezas en el año 2019. Del total, 74 millones pertenecían a pequeños rumiantes y de estos, únicamente 62 millones a ganado ovino, situando a España como el segundo país con mayor censo de ovinos dentro de la UE con casi 16 millones de cabezas, por detrás del Reino Unido ⁵.

1.1 Producción ganadera ovina en España

Debido al carácter extensivo de una parte importante del sector ovino y ser una actividad asociada a zonas donde no existen otras alternativas económicas, este sector juega un papel fundamental en la vertebración del territorio, en la conservación del medio ambiente y en la generación de empleo en las zonas rurales. En los últimos años

ha demostrado su capacidad de adaptación a las nuevas condiciones del mercado, incrementando los intercambios comerciales con terceros países, así como promoviendo y potenciando la calidad de los productos obtenidos en España.

Con la reciente salida de Reino Unido de la UE, España se sitúa como el primer país en número de cabezas de ganado ovino dentro de la UE, representando un 25% del total (Fig. 1). Aunque el número de cabezas se ha mantenido mayormente estable, existe una tendencia ligeramente decreciente en los últimos años. De este modo, el número total se situaba en los 16,7 millones de cabezas en el año 2018, mientras que los últimos datos recogidos en 2021 apenas eran en 15,7 millones, 1 millón menos ⁶.

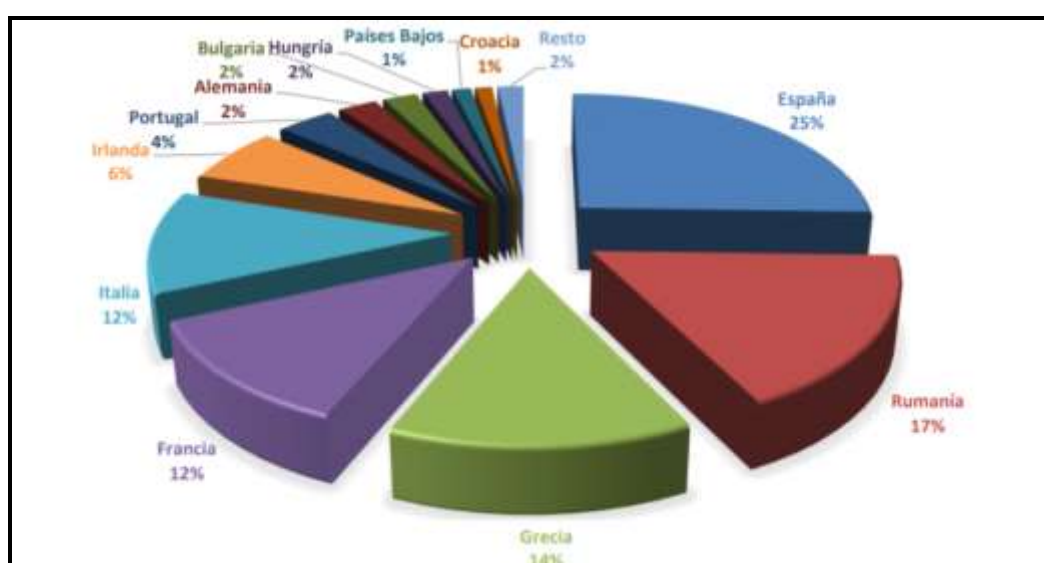


Figura 1. Distribución del censo ovino por países en la UE en 2020. Tomada de MAPA ⁷.

Las Comunidades Autónomas (CCAA) con mayor censo de ganado ovino son Extremadura (24,0%), Castilla y León (16,1%), Castilla La Mancha (15,4%), Andalucía (15,3%) y Aragón (10,4%), englobando un total del 81,2% del censo total nacional (Fig. 2).

Dentro de Castilla y León, el censo es de aproximadamente 2,5 millones de cabezas, siendo la provincia con mayor número de animales Zamora (23,4%), seguida de León (16,1%), Salamanca (13,7%) y Valladolid (11,2%) ⁸.

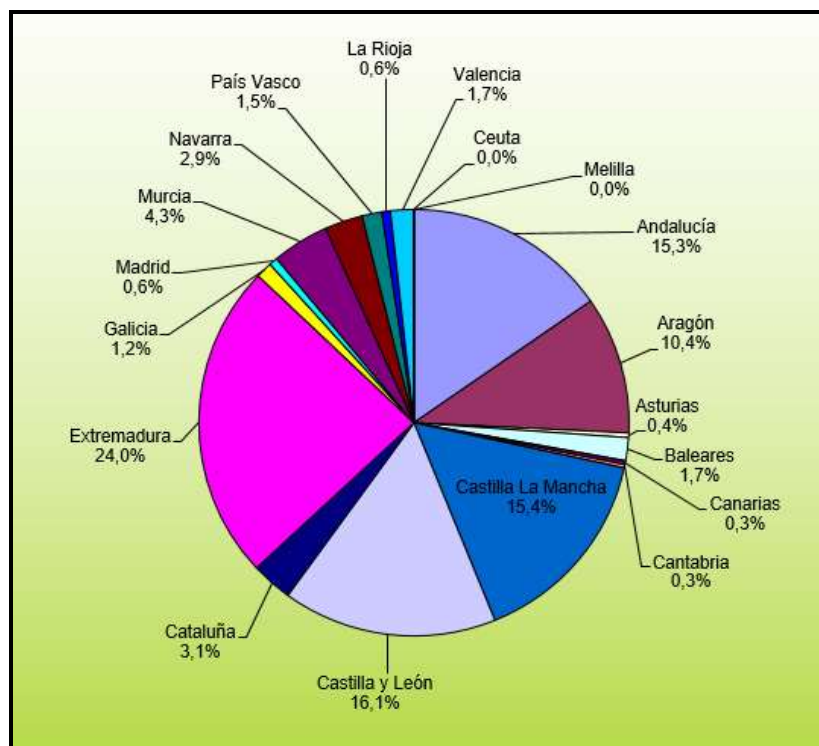


Figura 2. Distribución del total del censo ovino por Comunidad Autónoma en España (Julio 2021). Tomada de SITRAN ⁶.

Para España, como primer país productor de la UE, la ganadería ovina y caprina es un sector estratégico desde los puntos de vista económico, medioambiental y social. Teniendo en cuenta ambas orientaciones productivas (carne y leche), este sector representa en torno al 3,7% de la Producción Final Agraria nacional, con un valor estimado de 1.959,1 millones de euros en 2020. Respecto a la Producción Final de la rama Ganadera, el conjunto de las producciones de ovino-caprino ocuparía el quinto lugar en importancia económica en nuestro país, representando un 9,9% de la misma ⁹.

Más en detalle, el valor de la producción de carne de ovino y caprino alcanzó los 1.110,9 millones de euros en 2020, mientras que la producción de leche tuvo un valor estimado de 848,2 millones, suponiendo así el 26% del valor de la producción láctea nacional, que en el año 2020 llegó a los 3.280,7 millones de euros incluyendo la leche de vaca (74%), oveja (15%) y cabra (11%) ¹⁰.

En cuanto a la producción de carne, Castilla y León, Castilla la Mancha, Cataluña, Aragón y Murcia concentraron alrededor del 76% de los sacrificios totales de ovino en España en el año 2020. El 92% de los ovinos sacrificados se incluyeron dentro de la categoría de corderos frente al 8% de animales que finalizaron su vida

reproductiva. Castilla y León, Castilla la Mancha y Navarra son las CCAA con mayor porcentaje de corderos lechales sacrificados en relación a otro tipo de corderos, mientras que Aragón, Cataluña y Murcia produjeron en su mayoría corderos de entre 10 y 13 kg ⁹.

En el caso de la producción láctea, la modernización y reestructuración del sector ha permitido incrementar el rendimiento de los animales, reflejándose en un aumento de los niveles de producción durante los últimos años. La sustitución a gran escala de razas autóctonas por razas foráneas mejoradas, como la raza Assaf o Lacaune, ha cambiado el perfil de producción del sector, predominando ahora un modelo productivo basado en genética especializada y explotaciones intensivas con estabulación permanente. A esto se le une un alto grado de especialización y profesionalización de la mano de obra.

Las CCAA con mayor número de ganaderos son Castilla y León (58%) y Castilla La Mancha (27%), que reúnen el 85% del total. Por detrás, otras como Navarra, con solo el 4%, o Extremadura, con el 3% (Fig. 3) ¹⁰.

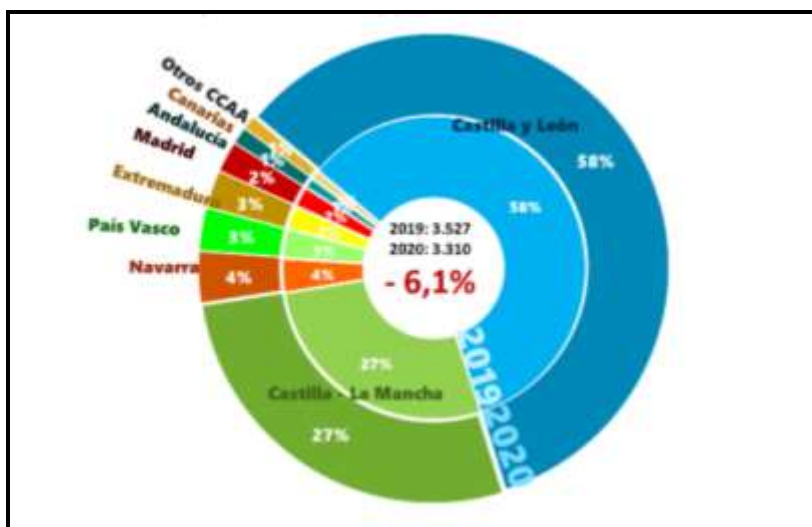


Figura 3. Promedio de ganaderos con entregas de leche cruda de oveja por Comunidades Autónomas en 2020 vs 2019 (%). Tomada de MAPA ¹⁰.

El ganado ovino ejerce un papel relevante en el medio rural español al permitir fijar población permanente en zonas agrarias desfavorecidas, contribuyendo a la preservación medioambiental, social y económica, junto al ganado caprino.

Las explotaciones ganaderas en España se pueden agrupar según el sistema de manejo en explotaciones extensivas, semi-extensivas o semi-intensivas e intensivas. Los sistemas de explotación intensiva implican un gran nivel de estabulación, aporte de alimento, lactancia artificial así como el empleo de razas muy fértiles. Es por ello que estos sistemas requieren de una técnica de explotación animal altamente tecnificada, de forma que permita obtener altos rendimientos productivos en el menor tiempo posible. Por el contrario, los sistemas extensivos de producción animal se basan en la utilización de especies ganaderas capaces de aprovechar eficazmente los recursos naturales mediante el pastoreo. Este tipo de explotación permite el aprovechamiento de recursos naturales que de lo contrario se perderían, siendo las exigencias de capital y mano de obra mínimas, por lo que la rentabilidad, con relación al capital invertido, es elevada. La producción se orienta principalmente a la obtención de carne o lana. En un punto intermedio, se encuentran los sistemas semi-intensivos o semi-extensivos, que suponen una combinación del aprovechamiento de los recursos naturales de los pastos con el apoyo alimenticio en el corral gracias a la mayor estabulación, logrando una intensificación productiva. Como resultado se obtiene un mayor aprovechamiento de los recursos tanto naturales como humanos ¹¹⁻¹⁴.

En los sistemas de explotación extensivos o semi-extensivos para la cría del ganado aumentan de forma notable las posibilidades de que estos animales adquieran infecciones de etiología parasitaria que, sin duda, repercutirán negativamente sobre las producciones ganaderas ¹⁵. Es por este motivo por lo que prácticamente en la totalidad de los rebaños explotados en este tipo de sistemas aparecen animales infectados por parásitos helmintos, siendo los nematodos gastrointestinales (NGI) los más comunes de todos ellos ¹⁶.

2. NEMATODOSIS GASTROINTESTINALES

Las infecciones causadas por NGI son una de las principales causas de enfermedad y de disminución de los rendimientos productivos en los rumiantes en pastoreo de todo el mundo, especialmente en el ganado joven ^{17,18}. Se tratan de las parasitosis más frecuentes e insidiosas del ganado ovino, ya que prácticamente la totalidad de los rebaños las sufren. A pesar de su distribución geográfica mundial, suelen ocasionar más problemas en zonas de clima templado y húmedo, así como también en zonas de clima tropical ¹⁹.

La gravedad de las enfermedades causadas por los NGI depende principalmente de factores relacionados con el propio parásito, como las especies presentes en el tracto gastrointestinal y la carga de los mismos en el animal; de factores propios del hospedador, como el estado nutricional o inmunológico, la especie y la raza; y de factores ambientales como el clima, una importante variable que determina aspectos como la humedad ambiental, temperatura, luz, lluvia y viento de la zona ²⁰.

Como se puede observar en la Figura 4, existe una gran variedad de nematodos que parasitan el aparato digestivo del ganado ovino. Sin embargo, los géneros que con mayor frecuencia se presentan en los animales pertenecen principalmente a tres superfamilias: Trichostrongyloidea, que incluye los géneros *Trichostrongylus*, *Teladorsagia*, *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Marshallagia*, *Cooperia* y *Nematodirus*; Strongyloidea, que incluye los géneros *Chabertia* y *Oesophagostomum*; y Ancylostomatoidea, que incluye el género *Bunostomum* ^{21,22}. Otro género ampliamente distribuido en ovinos es *Trichuris*, dentro de la superfamilia Trichuroidea. Entre las diversas especies de este género, cabe destacar *T. ovis*, que infecta el ciego y colon también de cabras, bovinos y otros rumiantes en todo el mundo. No es muy habitual que provoquen infecciones graves en animales adultos, sin embargo, en ocasiones cargas parasitarias elevadas pueden dar lugar a manifestaciones clínicas importantes en corderos jóvenes. En los casos graves, puede aparecer colitis sanguinolenta que puede causar lesiones ulcerosas y necróticas en la mucosa. En estos

casos, la anemia, la deshidratación y la ictericia pueden conducir a la muerte de los animales ²³.

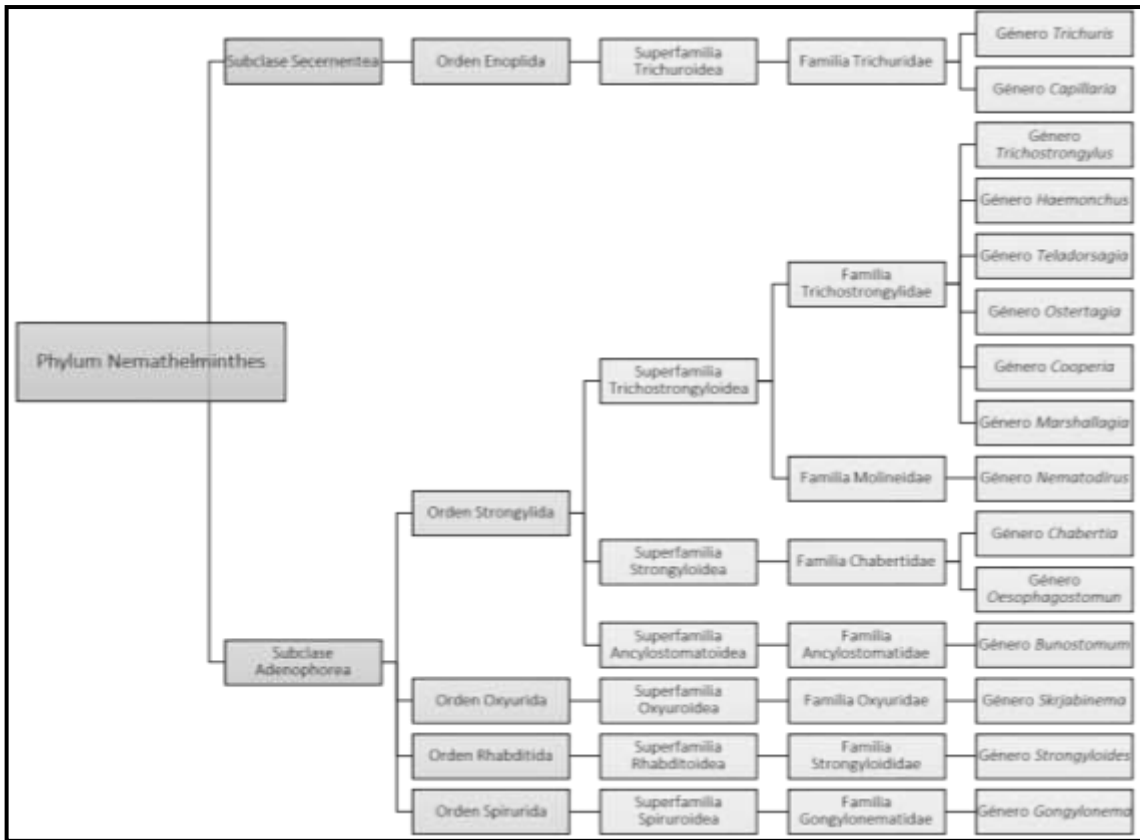


Figura 4. Encuadre taxonómico de los nematodos gastrointestinales de ovino. Adaptado de Cordero del Campillo & Rojo Vázquez ²⁴.

Normalmente, suelen encontrarse infecciones mixtas o pluriespecíficas, es decir, que están producidas por varios géneros y/o especies diferentes de NGI, aunque también es posible encontrarlas junto con otros parásitos helmintos pertenecientes a las clases Trematoda y Cestoda. De ahí el nombre que reciben de “gastroenteritis parasitarias”, siendo las más frecuentes de todas las producidas por los trichostrongílicos ²².

Aunque no es habitual, las especies parásitas del ganado bovino pueden encontrarse también en ovinos o caprinos y viceversa. Asimismo, pueden localizarse en zonas no específicas y es frecuente encontrar especies que asientan en varias zonas del aparato digestivo ²⁴.

2.1 Ciclo biológico de los tricostrongídeos

El ciclo biológico de los tricostrongídeos es directo, con una fase de vida libre en el medio ambiente también conocida como exógena y otra fase en el interior del hospedador o endógena ²⁴.

La fase exógena comienza cuando las hembras adultas de los parásitos que se encuentran en el abomaso o intestino (Tabla 1) comienzan a eliminar huevos que son expulsados al exterior del animal a través de las heces. Una vez en el medio ambiente, comienza el desarrollo dentro del huevo de la larva de primer estadio (L₁), que sale del huevo cuando este eclosiona. Este desarrollo se produce dentro de la masa fecal, ya que proporciona cierta protección frente a las condiciones ambientales.

HOSPEDADOR	ABOMASO	INTESTINO
BOVINO	<i>Ostertagia ostertagi</i>	<i>Cooperia oncophora</i> <i>Cooperia punctata</i> <i>Nematodirus helvetianus</i>
OVINO/CAPRINO	<i>Teladorsagia circumcincta</i> <i>Teladorsagia trifurcata</i> <i>Haemonchus contortus</i> <i>Trichostrongylus axei</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> <i>Trichostrongylus vitrinus</i> <i>Trichostrongylus capricola</i> <i>Nematodirus filicollis</i> <i>Nematodirus spathiger</i> <i>Nematodirus battus</i> <i>Marshallagia marshalli</i> <i>Cooperia curticei</i>

Tabla 1. Localización anatómica de los tricostrongídeos. Adaptado de Cordero del Campillo & Rojo Vázquez ²⁴.

Una vez en el medio ambiente, las larvas sufren dos mudas para alcanzar el tercer estadio larvario (L₃), también conocido como fase infectante. Las L₃s se desplazan de la materia fecal al forraje, donde son ingeridas por los animales ²⁵.

La cutícula se sustituye con cada muda menos en el caso de la L₃, que conserva la cutícula de la segunda fase como vaina. Aunque esta proporciona a las larvas una mayor resistencia a las condiciones ambientales adversas, también les impide

alimentarse, por lo que deben sobrevivir a expensas de las reservas acumuladas en sus células intestinales ¹⁹.

Cabe señalar que el ciclo de vida del género *Nematodirus* es una excepción a lo descrito anteriormente. En este caso, el desarrollo larvario se produce por completo dentro del huevo, por lo que la eclosión no se produce hasta que la L₃ está completamente formada en su interior. *M. marshalli* también tiene un ciclo de vida distinto, ya que es la larva de segundo estadio (L₂) la que eclosiona y abandona el huevo ²⁵.

Tras la ingestión de las L₃s, estas se desenvainan en respuesta a los cambios en la concentración de CO₂, la temperatura y el pH, y llevan a cabo dos mudas más en las que pasan por larvas de cuarto (L₄s) y de quinto estadio (L₅s) o preadultos, que maduran sexualmente y se transforman en adultos ²⁶. Los lugares donde las larvas pierden la vaina son específicos de cada especie y suelen estar próximos a la localización definitiva de los adultos. Las L₃s, al entrar en contacto con la mucosa, penetran entre los espacios de las vellosidades o en las glándulas y forman un nódulo, donde se desarrollan a L₄. Posteriormente, pasan a la luz del órgano donde se encuentran como preadultos y adultos. Tras la fecundación de las hembras, comienza la puesta de huevos que salen del hospedador a través de las heces, cerrándose de esta manera el ciclo biológico (Fig. 5) ²⁴.



Figura 5. Ciclo biológico de los tricostronglidos. Elaborada por la propia autora.

En condiciones óptimas de temperatura y humedad, el tiempo necesario para la formación de la L₃ varía entre 5 a 14 días, aunque en condiciones naturales puede

alargarse hasta 3-4 meses. El tiempo que transcurre desde el momento de la infección hasta que la hembra comienza la eliminación de huevos se conoce como periodo de prepatencia y aunque es específico de cada especie suele situarse de media en torno a los 21 días. Géneros como *Trichostrongylus* y *Teladorsagia* necesitan aproximadamente periodos de 17 días, mientras que *Haemonchus* necesita 20 días, *Nematodirus* 28 días y *Cooperia* unos 15 días ²⁴.

Durante el ciclo vital de *N. battus*, las larvas no eclosionan en el momento de la madurez, sino que generalmente requieren de una bajada significativa de la temperatura ambiente durante varias semanas, seguido de temperaturas dentro del rango de eclosión de alrededor de 11-17 °C. Por lo tanto, los huevos producidos por los corderos en primavera y a principios de verano producen L₃s en la primavera siguiente, infectando así los pastos de los corderos del año siguiente ²⁷.

2.2 Epidemiología

La prevalencia de las infecciones producidas por NGI en las poblaciones animales está determinada en gran medida por las condiciones ambientales ²⁸. Mientras que la fase parasitaria del ciclo vital de los NGI experimenta condiciones relativamente estables dentro del hospedador, la fase de vida libre está expuesta a numerosas variaciones de las condiciones ambientales. Por ello, conocer la biología de los estadios inmaduros del parásito es fundamental para predecir su distribución y formular programas de gestión integrada para su control ²⁹.

Por lo tanto, cualquier alteración medioambiental va a llevar implícita una modificación en la abundancia y distribución de las especies de NGI, siendo las más importantes la temperatura y la humedad ³⁰. Por lo general, el desarrollo de las larvas de tricostrongílidos en el ambiente, desde el huevo hasta L₃ se produce en un rango de temperatura de aproximadamente 10 a 36°C. Las temperaturas críticas por debajo de las cuales el desarrollo no tiene lugar se han estimado en 5° C para *Ostertagia* spp y 12° C para *H. contortus*. Sin embargo, dentro de este rango, las especies tienen distintas preferencias. De esta manera, *H. contortus* se describe a menudo como un parásito de los trópicos y se desarrolla hasta L₃ con mayor éxito a temperaturas de unos 25-38° C mientras que *T. circumcincta* es más tolerante al frío y el desarrollo de

los huevos hasta L₃ se produce mejor a temperaturas entre 16°C y 30°C ³¹. En el caso de *Trichostrongylus* spp., se sitúa entre ambos géneros en términos de preferencia de temperatura, aunque cabe destacar que es la más tolerante a la sequía de estos tres géneros ³².

Otro factor importante para el desarrollo exitoso de L₃s es la humedad. En este sentido, hay que tener en cuenta no solo las precipitaciones, sino también el estado de hidratación del suelo, de la hierba y de los gránulos fecales. En general, la sequía perjudica el desarrollo del parásito mientras que las condiciones de humedad lo favorecen ^{29,30,33}.

Una vez que las larvas alcanzan el estado infeccioso, deben abandonar los gránulos fecales y migrar al forraje. Para ello es necesario que llueva, ya que, durante el periodo de sequía, las larvas quedan retenidas en los gránulos de heces. Dado que las larvas sólo pueden realizar movimientos ondulatorios con su cuerpo y no arrastrarse, la migración es un proceso bastante pasivo que depende en gran medida de la disponibilidad de humedad. Algunas larvas de *H. contortus* pueden migrar hasta 90 cm de distancia de los gránulos fecales, aunque la mayoría suelen permanecer en torno a unos 10 cm. Además, la mayoría de las L₃s de NGI no suelen migrar verticalmente a más de 5 cm del suelo. Este hecho tiene importantes implicaciones en el manejo del forraje de los pastos; los animales obligados a pastar en forrajes cortos ingerirán un número mucho mayor de larvas que cuando pastan en forrajes altos ³¹.

Otro factor a tener en cuenta es la luz solar, pues la exposición solar directa provoca la muerte de las larvas ^{33,34}. La supervivencia de las larvas depende también de las especies de parásitos con las que convivan, de la ubicación de las mismas en los pastos y de la altura del forraje, lo que hace muy difícil predecir con exactitud su permanencia en un lugar específico ²⁹.

Por consiguiente, las mejores condiciones para la supervivencia de las L₃s son un clima fresco y seco, ya que la ausencia de humedad reduce el movimiento de las larvas y por lo tanto, la utilización de sus reservas almacenadas. El clima fresco y húmedo también favorece su supervivencia durante muchos meses. Sin embargo, los

climas cálidos aumentan la tasa metabólica de las larvas, haciendo que agoten sus reservas energéticas rápidamente ³⁴.

Tras la infección del hospedador definitivo, las larvas de algunos NGI son capaces de inhibir su desarrollo durante un periodo de tiempo que puede llegar a durar hasta 4, o incluso 5 meses, y luego reanudarlos. Durante este tiempo, las larvas no se desplazan ni se alimentan y su metabolismo celular se encuentra reducido, aunque no por completo. Este fenómeno, conocido como hipobiosis, se ha descrito solo en algunos géneros, como las L₄s de *Teladorsagia*, *Haemonchus* y *Nematodirus*, y las L₃s de *Trichostrongylus* ³⁵.

Aunque todavía no se conoce con exactitud el estímulo que produce la hipobiosis, se ha observado que está fuertemente influenciado por factores ambientales como la humedad, temperatura y fotoperiodo ³⁶. Se trata de un fenómeno adaptativo que asegura la preservación del parásito en condiciones ambientales adversas, como ocurre durante las estaciones secas en zonas de clima tropical, o durante los meses de invierno en las zonas de clima templado ^{35,37}.

En zonas donde los inviernos son muy suaves, la hipobiosis parece ser menos importante en la epidemiología de la transmisión del parásito, sin embargo diferentes estudios parecen señalar que también pueden influir factores dependientes del hospedador (estado inmunológico, edad y exposición previa) y del parásito (base genética y competencia intraespecífica cuando la ingestión de larvas es muy elevada) ^{38,39}.

Básicamente, las condiciones climáticas pueden dar lugar a un patrón estacional en el que se produce una inhibición invernal, cuando la inhibición del desarrollo comienza antes del invierno en regiones de clima templado, o una inhibición de verano, cuando la inhibición se inicia antes del verano o de una estación seca ⁴⁰.

En los meses de primavera, existe un marcado aumento del recuento del número de huevos de NGI eliminados en las heces de los animales que se conoce como “elevación peri-parto” o “incremento primaveral”. Este fenómeno ocurre en la época en la que se concentran la mayoría de las parideras en esta especie, por lo que los huevos eliminados en este periodo de tiempo desempeñan un papel importante en

la epidemiología de estos parásitos. Esto ha llegado a vincularse firmemente con la hipobiosis, ya que se trata de una desinhibición sincrónica de larvas hipobióticas, relacionándose directamente con una menor respuesta del sistema inmunitario de los animales como consecuencia del parto y la lactancia, pero también con estímulos de tipo ambiental, como el fotoperiodo ⁴⁰⁻⁴².

2.2.1 Distribución de los principales géneros de nematodos gastrointestinales

Los tricostrongídeos más importantes en términos de enfermedad y pérdida de producción a nivel global incluyen los géneros de *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Haemonchus* y *Nematodirus*. Otros, como *Cooperia*, *Chabertia*, *Oesophagostomum* y *Marshallagia*, pueden ser importantes en algunas circunstancias, pero normalmente forman parte de una infección mixta ²⁷.

Las encuestas de prevalencia y estudios de epidemiología de campo llevados a cabo en diversas regiones de Europa proporcionan una imagen cualitativa de la distribución e importancia relativa de las diferentes especies de NGI. Así pues, de acuerdo con las observaciones sobre su biología, *H. contortus* tiende a ser más común y a constituir una mayor amenaza para la salud y producción ovina en las zonas más cálidas del sur, mientras que *T. circumcincta* es el nematodo dominante en las regiones templadas y septentrionales. *Trichostrongylus* y *Nematodirus* en cambio, son ubicuos y su importancia varía a escala local ^{27,43}.

Por lo que se refiere a *N. battus*, es también causa importante de enfermedad en corderos de la zona norte de Europa, debido a que los huevos de esta especie generalmente requieren un enfriamiento prolongado a temperaturas inferiores a 11 °C antes de su eclosión ⁴⁴. Sin embargo, algunos estudios más recientes han demostrado que existen poblaciones de huevos que son capaces de eclosionar sin la necesidad de este estímulo, lo que explica el creciente aumento de la presencia de esta especie también en zonas del sur ^{45,46}. Además, la dureza de los huevos y el retraso en la eclosión facilita a este género, junto con *Marshallagia*, para su transmisión en climas áridos del norte de África ⁴⁷, y, en la zona seca paramediterránea ²⁷.

La importancia de las distintas especies como causantes de enfermedades en el ganado ovino depende no sólo de su presencia, sino también de su abundancia y de los

patrones estacionales de infección en relación con el ciclo de producción. En particular, las infecciones mixtas son comunes en todas las regiones.

Así, incluso donde *H. contortus* es común, es probable que se encuentre junto a *T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp., siendo la enfermedad el resultado de complejas interacciones entre cada especie y la fisiología e inmunidad del hospedador^{48,49}, así como entre los propios parásitos^{50,51}.

En los últimos años se están evidenciando cambios en la distribución de las diferentes especies de NGI por todo el mundo como consecuencia de la capacidad de adaptación progresiva de algunos parásitos a condiciones climáticas desfavorables, pero también como consecuencia del creciente aumento de la temperatura media anual derivada del calentamiento global. El aumento de la temperatura en las regiones templadas favorece notablemente la supervivencia y desarrollo de los parásitos en el medio ambiente, así como la transmisión de numerosas enfermedades^{4,52}.

Es por ello que durante los últimos años *H. contortus*, una especie clásicamente termófila, con un rango de temperatura óptimo alto en relación con otros trichostrongílidos, así como una mayor resistencia a la desecación y a la irradiación ultravioleta²⁹, ha ido adquiriendo mayor importancia en Europa, especialmente en la zona norte⁵³, así como *N. battus* lo ha hecho en la zona sur²⁷. Este mismo fenómeno se ha descrito también en otras zonas del mundo como Estados Unidos³¹ y Australia⁵⁴, y se espera que esta situación siga agravándose de manera importante con el paso de los años^{53,55}.

En el modelo epidemiológico de la Península Ibérica que se encuentra en condiciones de secano, hay un incremento del número de larvas en el pasto entre octubre y febrero (máximo en noviembre), según regiones, y un descenso posterior en marzo-abril, desapareciendo prácticamente entre junio y septiembre. En áreas de regadío, el modelo se caracteriza por tres máximos de larvas. El primero se extiende hasta abril y procede de los huevos eliminados por los animales durante el pastoreo del otoño anterior. El segundo comprende mayo y junio, y está originado por el desarrollo de los huevos de la elevación de periparto de marzo. El último abarca los meses de octubre a diciembre y se debe a los huevos eliminados al final del verano²⁴.

2.3 Fisiopatología y signos clínicos producidos por los NGI

La presencia de los NGI en el abomaso e intestino de los rumiantes provoca importantes alteraciones en la función gastrointestinal, así como en metabolismo proteico, energético y mineral. Numerosos estudios han confirmado que los animales parasitados muestran una reducción en el nivel de ingestión, así como alteraciones del comportamiento ⁵⁶⁻⁶⁰. Todo esto implica disminuciones significativas del rendimiento productivo de los animales ^{61,62}, que en definitiva se traduce en importantes pérdidas económicas para la industria ganadera ⁶³⁻⁶⁵.

Aquellas especies localizadas en el abomaso van a provocar hipertrofia de la mucosa, como consecuencia de una infiltración de células inflamatorias; hiperplasia general de las células productoras de moco, combinada con una erosión de las células mucosas epiteliales superficiales; y disminución del número de células parietales funcionales, responsables de la producción de ácido clorhídrico (HCl) y su sustitución por células anormales no diferenciadas ⁶¹.

La alteración de la producción de HCl influye en el pH del contenido del abomaso. Se ha observado aumentos de 2,6 a 3,6, con picos transitorios de hasta 6,0, dependiendo del curso de la infección ⁶¹.

Este aumento del pH reduce la conversión del pepsinógeno en pepsina activa, facilitando el paso de macromoléculas, como el pepsinógeno, al torrente sanguíneo a través de los complejos de unión entre las células endoteliales y epiteliales dañadas ⁵⁸. También favorece la posible colonización del tracto digestivo con bacterias que normalmente son inactivadas por el bajo pH en animales no infectados, favoreciendo la aparición de diarrea y produciendo alteraciones de los niveles circulantes de hormonas gastrointestinales, como la gastrina.

El aumento de la secreción de gastrina se ha descrito en algunas especies de NGI como *H. contortus* y *T. circumcincta*, relacionándose con el aumento de la contractibilidad del abomaso y del peristaltismo intestinal ²⁴, que pueden verse afectados también por sustancias liberadas de origen parasitario, como las colinesterasas de los nematodos ⁶⁶.

En la necropsia pueden hallarse parásitos embebidos en la mucosa junto con lesiones crateriformes (áreas uniformemente grisáceas con bordes intensamente marcados). La lámina propia aparece engrosada, edematosa e infiltrada por células inflamatorias. Como consecuencia, se produce un incremento de la permeabilidad de los capilares y venas, apertura de las uniones entre las células epiteliales y pérdida de proteínas plasmáticas en el intestino, lo que desencadena hipoalbuminemia. En las áreas afectadas, se observa una atrofia de las vellosidades de grado variable, junto con un adelgazamiento de la mucosa y redondeamiento de los ápices de las células epiteliales, con microvellosidades escasas e irregulares. Los NGI de localización intestinal, tales como *T. colubriformis* y *T. vitrinis*, producen una patología similar en la porción anterior del intestino delgado.

En conjunto, estos cambios afectan a los procesos digestivos del abomaso, disminuyendo la digestibilidad del alimento como consecuencia de la reducción de las funciones enzimáticas, del aumento del peristaltismo, de la pérdida de proteínas plasmáticas y malabsorción. El rápido recambio de las células epiteliales origina malabsorción, puesto que las células epiteliales inmaduras carecen de las enzimas necesarias para la digestión, reduciendo de esta manera el transporte de vitaminas, aminoácidos e hidratos de carbono ⁶⁷.

Por tanto, la deficiencia proteica es consecuencia de la disminución de la ingestión voluntaria de los animales, la menor eficiencia de digestión de proteínas, la pérdida de proteínas en el tracto gastrointestinal por la ruptura de la barrera epitelial y el desvío de proteínas hacia respuestas inmunitarias e inflamatorias ⁶⁸.

En las infecciones monoespecíficas con nematodos abomasales, la reducción de consumo de alimento se explica por el aumento de las concentraciones de gastrina en sangre y la liberación de gastrina y pepsinógeno en el abomaso ⁶⁶. En el caso de los nematodos localizados a nivel intestinal, Sykes & Coop ⁶⁹ sugirieron que la reducción se debe a un desequilibrio en la cantidad de aminoácidos que llegan al hígado y a los tejidos periféricos. Esto se debe al secuestro prioritario de aminoácidos para la recuperación del tejido gastrointestinal y para el desarrollo de la expresión de la respuesta inmunitaria.

La infección producida por *H. contortus* desencadena además otra serie de alteraciones derivadas de la capacidad hematófaga de las L₄s y los adultos, así como de su elevado índice reproductivo en comparación con otros géneros de NGI. La mucosa gástrica además de inflamada, se puede encontrar cubierta de petequias, que en ocasiones pueden llegar a úlceras. Cada parásito es capaz de absorber entre 30 y 50 µL de sangre al día, lo que puede derivar en estados severos de anemia ²⁸.

Hay que tener en cuenta que la carga parasitaria influye de manera importante en la aparición de signos clínicos. Normalmente, las cargas bajas tienen poco impacto en la salud de los animales, dando lugar a la aparición de sintomatología subclínica, mientras que infecciones elevadas pueden llegar a producir enteritis severa y diarrea acompañado de una importante pérdida de peso en los animales, letargo y deshidratación ^{58,67}. En el caso de *H. contortus*, el más patógeno de todos ellos, puede causar además fuerte anemia, edema e incluso la muerte del animal ⁷⁰.

La gravedad de la infección también depende de otros factores como la edad del hospedador, el estado nutricional e inmunológico del animal, la virulencia de la cepa del parásito, etc. Además, los factores ambientales locales comentados anteriormente también pueden agravar la situación ⁷¹.

3. CONTROL DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR NEMATODOS GASTROINTESTINALES MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS

Durante muchos años el control de este tipo de infecciones en el ganado se ha llevado a cabo satisfactoriamente mediante el uso de fármacos AHs ⁷². A grandes rasgos, los fármacos AHs se pueden dividir en dos grandes grupos: de amplio espectro y de espectro reducido. Los AHs de amplio espectro se caracterizan por ser eficaces frente a un amplio rango de parásitos helmintos, entre ellos diferentes especies de NGI ⁷³. Desde su comercialización, han sido los más utilizados en el control de las infecciones producidas por NGI en el ganado ovino debido a su gran eficacia y amplio margen de seguridad. Sin embargo, su excesiva e incorrecta utilización ha dado lugar a la aparición de la resistencia antihelmíntica (RA) en todo el mundo ^{72,74}. Las principales familias de fármacos AHs de amplio espectro comercializadas se explican a continuación.

3.1 Bencimidazol-carbamatos y probencimidazoles

A partir de la entrada en el mercado del tiabendazol ⁷⁵, se comenzaron a introducir nuevos derivados fruto de la fuerte competencia existente entre las compañías farmacéuticas ⁷⁶.

Los primeros BZs comercializados (tiabendazol y parabendazol) presentaban un espectro de acción reducido, sin embargo, con el paso del tiempo comenzaron a aparecer otros que actuaban no solo frente a NGI, sino también frente a nematodos pulmonares, cestodos y trematodos (oxibendazol, mebendazol, etc.) ⁷⁷. Estos compuestos, demostraron poseer una elevada eficacia frente a las formas adultas y larvarias del parásito, mientras que los introducidos años después (albendazol, fenbendazol, oxfendazol y ricobendazol), también demostraron ser eficaces frente a las larvas en hipobiosis ⁷⁸. El incremento de la actividad de los nuevos BZs se reflejó en una reducción de su dosis terapéutica, siendo de 25-50 mg/kg en el caso del tiabendazol, de 15 mg/kg para el mebendazol y de 5 mg/kg para el fenbendazol o albendazol, todos ellos por vía oral.

Una característica común de los BZs es que presentan una solubilidad muy limitada y, por tanto, también una absorción limitada en el organismo ⁷⁹. Este hecho ha dificultado su utilidad en el tratamiento de infecciones de tipo sistémico como la equinococosis alveolar o quística, o las nematodosis pulmonares ⁸⁰. Sin embargo, aquellos BZs menos solubles persisten durante periodos de tiempo más prolongados en el plasma y en el tracto gastrointestinal, lo que explica, en parte, la mayor actividad antihelmíntica de fármacos como el fenbedazol en comparación con el tiabendazol o el cambendazol ^{81,82}.

Los pro-BZs son fármacos inactivos que se convierten enzimáticamente en etil o metil BZ carbamatos, mayoritariamente en el hígado, una vez que son absorbidos por el hospedador. De este modo reciben el nombre de precursores de los BZs ⁸². Su desarrollo se inició principalmente como una forma de aumentar su solubilidad ⁸³. Entre ellos encontramos el febantel, netomibin y el tiofanato. Una vez en el organismo, el febantel se transforma en fenbendazol, el netobimin en albendazol y el tiofanato en un compuesto bencimidazólico no comercializado como tal.

Esta familia de fármacos también favorece el control epidemiológico de la infección debido a su actividad ovicida. Esto se debe a que los huevos de muchas especies de nematodos, cuando se exponen a uno de estos fármacos en el contenido intestinal de los animales tratados, no eclosionan después de eliminarse con las heces en los pastos ⁸⁴.

El mecanismo de acción inicial de esta familia de compuestos se pensaba que era la inhibición de varias enzimas metabólicas del parásito, como la fumarato reductasa y la malato deshidrogenasa ^{85,86}. Sin embargo, estudios posteriores establecieron que el mecanismo principal de los BZs es la unión selectiva a la beta-tubulina del parásito, lo que inhibe selectivamente la polimerización de los microtúbulos en las células de los nematodos, provocando la destrucción de la estructura celular y la consiguiente muerte del parásito (Fig. 6) ⁸⁷.

Los microtúbulos son estructuras intracelulares que se forman por la combinación de dos proteínas de unos 450 aminoácidos que se denominan α -tubulina y β -tubulina. Estos, son vitales para la supervivencia de las células eucariotas y

desempeñan funciones intracelulares críticas que incluyen la formación de un citoesqueleto dinámico, el transporte intracelular, la absorción de nutrientes y la división celular ^{77,88}.

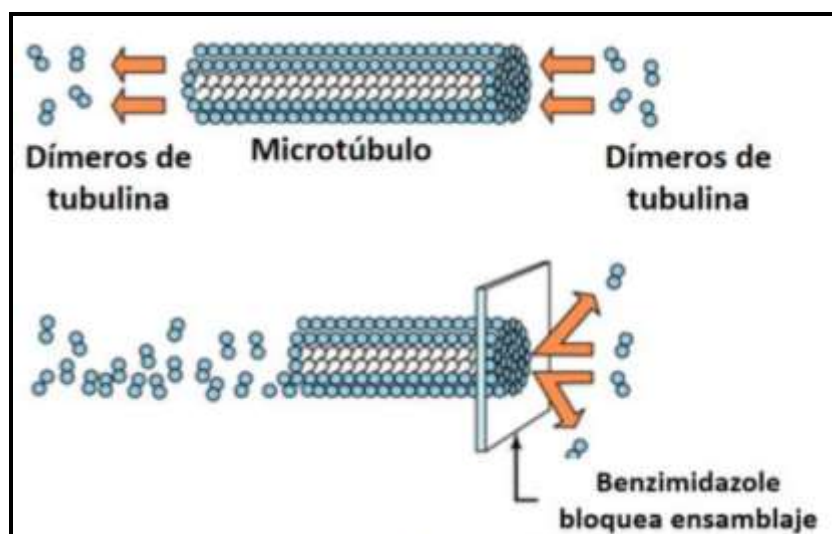


Figura 6. Mecanismo de acción de benzimidazoles. Inhibición de la polimerización del microtúbulo por la unión del benzimidazol a la β -tubulina. Figura adaptada de Dib Brusales ⁸⁹.

3.2 Lactonas macrocíclicas

La acción antihelmíntica de las lactonas macrocíclicas (LMs) se descubrió por primera vez a principios de los años 70, siendo la ivermectina el primer fármaco introducido en el mercado, en 1981 ⁹⁰. Estos compuestos son los AHs más utilizados en medicina veterinaria en todo el mundo ⁷⁴. Su éxito se debe a su potente y amplio espectro de actividad frente a nematodos y artrópodos, a su perfil de seguridad y a su fácil administración ⁹¹.

Las LMs se dividen en dos grupos: las avermectinas y las milbemicinas. Las avermectinas son productos resultantes de la fermentación de *Streptomyces avermitilis* e incluyen la abamectina, la ivermectina, la doramectina y la eprinomectina. El otro grupo de fármacos es el de las milbemicinas, obtenidas a partir de la fermentación de *S. hygroscopicus* (milbemicina D) y *S. cyanogrisum* (moxidectina). La más utilizada es la moxidectina y, en menor medida, la selamectina y la milbemicina D ⁹². La dosis indicada para el tratamiento de los NGIs es bastante menor en comparación con el grupo de los BZs. Se recomienda la administración oral de ivermectina, abamectina y doramectina a una dosis de 0,2 mg/kg, mientras que la

moxidectina se recomienda a una dosis de 1 mg/kg. Además, son eficaces frente a NGL, nematodos pulmonares, ácaros de la sarna e insectos como *Oestrus ovis*.

Ambos grupos de LMs comparten algunas propiedades fisicoquímicas generales. Aún así, presentan pequeñas diferencias en la estructura química que determinan cambios en su comportamiento farmacocinético, lo que se traduce en diferencias en la eficacia y la biodisponibilidad de las mismas en el organismo ⁹³. En el caso de la moxidectina, se ha comprobado que su persistencia en el organismo es mayor que en el caso de la ivermectina o la abamectina, de ahí su utilización en formulaciones de acción prolongada. Esto se puede explicar debido a su mayor lipofilia y menor afinidad por la glicoproteína P (P-gp) ^{94,95}. En este sentido, se ha comprobado que la moxidectina es la más eficaz de todas las LMs para el tratamiento de infecciones producidas con cepas resistentes ⁹⁶.

Los primeros estudios en este campo propusieron que el mecanismo de acción de las LMs se basaba en la estimulación de la liberación del ácido gamma aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nervioso Central ^{97,98}, sin embargo, ahora se consideran dianas secundarias ⁹⁹. Tiempo después, sugirieron que la acción de las LMs viene dada principalmente por la interacción de las mismas con los canales de cloro (Cl⁻) activados por glutamato (GluCl), miembros de la superfamilia de canales iónicos activados por ligandos (LGIC) ¹⁰⁰⁻¹⁰². Estos GluCl son receptores inhibidores que se encuentran en los tejidos neuronales y musculares de nematodos, insectos y garrapatas, lo que les hace dianas farmacológicas ideales ¹⁰³.

La interacción de las LMs con los GluCl provoca un incremento en la permeabilidad neuromuscular de los Cl⁻ ⁹¹ que desencadena una hiperpolarización. Por lo tanto, el fármaco bloquea la neurotransmisión en las sinapsis neuromusculares (Fig. 7), lo que se traduce en una parálisis de los músculos faríngeos y somáticos del parásito ¹⁰⁴.

Por lo tanto, al funcionar como agonistas de LGIC, las LMs producen una parálisis flácida de la musculatura somática y de los órganos reproductivos en los nematodos, que da lugar un cese en la ingestión de alimento debido a la inhibición del peristaltismo faríngeo.

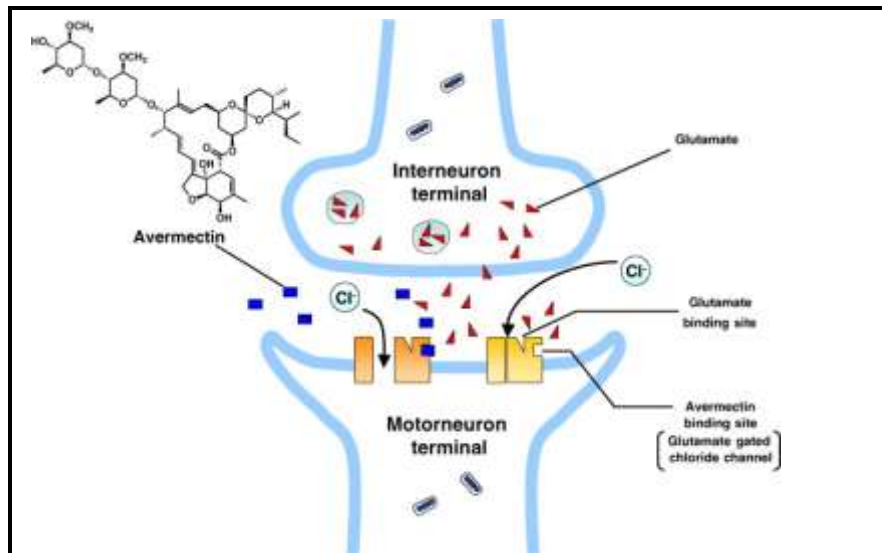


Figura 7. Modo de acción de la avermectina en la sinapsis de los nematodos. Tomada de Ōmura ¹⁰⁴.

Además, otros LGIC, como por ejemplo, los canales iónicos activados por la dopamina y la serotonina pueden verse también afectados por las LMs, contribuyendo así a la sensibilidad a los fármacos ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Por consiguiente, estos compuestos podrían tener un efecto más global en la neurotransmisión de los nematodos de lo que se había apreciado inicialmente.

3.3 Imidazotiazoles

A pesar de que el tetramisol fue el primer AH imidazotiazol que se introdujo en el mercado veterinario en 1967 ¹⁰⁸, el levamisol es el más utilizado en el mundo ¹⁰⁹.

El tetramisol está formado por una mezcla racémica de isómeros D y L, de los cuales el isómero levógiro (L) purificado, el levamisol, es el que le confiere la actividad frente a nematodos. Este descubrimiento permitió utilizar el levamisol a la mitad de dosis que el tetramisol, reduciéndose así el riesgo de toxicidad ⁸⁷.

Estos fármacos son eficaces frente a nematodos adultos y larvas del tracto gastrointestinal, y pulmón, aunque pierden eficacia frente a larvas en hipobiosis y carecen de actividad ovicida. Las dosis terapéuticas recomendadas son de 5 mg/kg para administraciones intramusculares y subcutáneas, y de 8 mg/kg para administraciones orales. Además, no presentan actividad frente a cestodos y trematodos ¹¹⁰.

Los imidazotiazoles actúan selectivamente como agonistas colinérgicos en los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) sinápticos y extra-sinápticos de las células musculares del nematodo ^{111,112}. Estos receptores en los nematodos son muy similares a los descritos en los mamíferos. Están formado por cinco subunidades (2 α , 1 β , 1 γ y 1 δ) y se encargan de controlar el flujo de sodio (Na²⁺), potasio (K⁺) y en menor medida calcio (Ca²⁺). Se ha observado que el sitio de unión se encuentra en la subunidad α de todos los receptores nicotínicos ¹¹³.

La activación persistente de los canales de cationes en las uniones neuromusculares, a través de la unión de estos fármacos, da como resultado la despolarización sostenida del sistema neuromuscular del nematodo, provocando una contracción y parálisis muscular espástica ¹¹⁴. El parásito por lo tanto, no es capaz de moverse libremente, alimentarse ni reproducirse, lo que conduce a su muerte o a su expulsión al medio externo ⁸⁷.

3.4 Derivados de aminoacetnitrilo

En 2008 se descubrió una clase nueva de compuestos sintéticos que mostraban elevada eficacia frente a los NGI, los derivados del aminoacetnitrilo (DAA) ¹¹⁵. Estos primeros compuestos activos de DAA fueron fruto de un proyecto de descubrimiento de AHs llevado a cabo por la empresa Novartis Animal Health, el cual se centró en el cribado compuestos previamente identificados como interesantes para indicaciones agrícolas. En primer lugar, estos compuestos de prueba se evaluaron *in vitro* mediante un ensayo fenotípico de cribado de compuestos denominado ensayo de desarrollo larvario o LDT (del inglés, *larval development test*), utilizando para ello larvas de *H. contortus* y *T. colubriformis*. A continuación, se llevaron a cabo estudios de eficacia y tolerabilidad en un modelo de roedor infectado con ambas especies, el jerbo de Mongolia ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

A partir de los resultados iniciales obtenidos con las moléculas más activas, se generaron más de 700 análogos diferentes de DAA con el fin de evaluar su potencial actividad antihelmíntica. Este proceso condujo a la identificación de las moléculas más activas, que luego fueron evaluadas en ovinos y bovinos. Después de toda la batería de

pruebas, se seleccionó el compuesto AAD-1566 (monepantel) para entrar en la fase de desarrollo industrial ¹¹⁸.

En 2009 y 2010 el monepantel se comercializó por primera vez en Nueva Zelanda y Australia, respectivamente ¹¹⁹. La Organización Mundial de la Salud dio al AAD-1566 el nombre de monepantel y lo introdujo como AH para ovejas (Zolvix™, Novartis Animal Health). Su utilización se recomendó en el caso de encontrar nematodos resistentes al resto de fármacos AHs. Posteriormente se registró para su uso en otras regiones de producción ovina importantes como Reino Unido, Países Bajos, Australia, Uruguay, Argentina y Brasil.

Una dosis oral de 2,5 mg/kg de monepantel ha mostrado elevada actividad frente a L4s y adultos de *H. contortus*, *Teladorsagia* spp, *Trichostrongylus* spp, *Cooperia* spp, *Nematodirus* spp, *C. ovina* y *O. venulosum*, incluyendo aislados resistentes a BZs, LMs, imidazotiazoles y a la combinación comercializada de derquantel y abamectina ^{118,120}.

El modo de acción de los DAA fue descrito por primera vez por Kaminsky *et al.* ¹¹⁶ en el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* y en *H. contortus*. Estos compuestos causan una hipercontracción de los músculos de la pared corporal que conduce a la parálisis, contracciones espasmódicas de la porción anterior de la faringe y, finalmente, la muerte del nematodo. La subunidad nAChR ACR-23 fue identificada como la diana molecular en *C. elegans* ¹²¹, lo que permitió posteriormente buscar proteínas homólogas en *H. contortus*. De esta manera, se identificaron varias mutaciones independientes en el gen *monepantel-1* (*Hco-mptl-1*) en cepas mutantes de *H. contortus* que presentaban una sensibilidad reducida a monepantel. Este hallazgo apoya la idea de que la subunidad Hco-MPTL-1 de nAChR de la subfamilia DEG-3, es la diana de acción principal de los DAA en esta especie ¹²². Dicha proteína es única y específica de nematodos, lo que hace que sea una diana farmacológica muy atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos ¹²³.

Por lo tanto, el monepantel actúa como un modulador alostérico positivo de la subunidad Hco-MPTL-1, que se ve forzada a abrirse ante un estímulo siendo incapaz de volver a cerrarse, lo que resulta en un flujo constante e incontrolado de iones y,

finalmente, en una despolarización de las células musculares que conduce a la parálisis ¹¹⁸.

Algunos estudios más recientes han observado que el monepantel es activo en múltiples subtipos de nAChRs, sugiriendo que podría presentar un mecanismo de acción más complejo de lo que se pensaba, ya que probablemente implique múltiples dianas de acción ¹²⁴.

3.5 Espiroindoles

El derquantel fue el primer fármaco comercializado de la familia de los espiroindoles. Se trata de un compuesto semisintético derivado de la parahercuamida, un producto resultante de la fermentación de *Penicillium simplicissimum*. Se introdujo en el mercado en 2010 en Nueva Zelanda y Sudáfrica bajo el nombre comercial de STARTECT® ¹²⁵. La falta de uniformidad en la eficacia del mismo frente a todos los géneros de NGI hizo que se comercializara en combinación con la LM abamectina, con la que presenta una interacción sinérgica ¹²⁶.

El derquantel actúa como antagonista de nAChRs del subtipo B mediante la inhibición de los canales 45-pS de los receptores, lo que provoca una parálisis flácida del parásito, facilitando su expulsión del hospedador ¹²⁷

Por sí solo, una dosis de 2 mg/kg de derquantel es eficaz frente a adultos y L₄s de *Trichostrongylus* spp. y *C. curticei*, así como frente a adultos de *H. contortus* y *N. spathiger*. Sin embargo, la eficacia frente a *T. circumcincta* es algo menor y más variable (70-95%), y escasa frente a adultos de *O. columbianum* y *T. ovis* ¹²⁶. Sin embargo, la combinación comercializada de derquantel con abamectina (2 mg/kg derquantel y 0,2 mg/kg abamectina) es activa frente a todas las L₄s y adultos de los NGI de mayor importancia económica, incluso en cepas resistentes a las principales familias de fármacos AHs, con la excepción de *T. trifurcata*, en la que la eficacia se ve reducida al 95,9% ¹²⁸.

3.6 Otros fármacos antihelmínticos

A continuación se incluyen algunos AHs de espectro más reducido que se utilizan para el tratamiento de los NGI en ovejas en menor medida que los descritos anteriormente.

- Los miembros del grupo de las **tetrahidropirimidinas** son el pirantel, morantel y oxantel. El pirantel (sales de pamoato y tartrato) es el primer compuesto de esta familia que se introdujo en 1966 como AH de amplio espectro para tratar los NGI de las ovejas. Posteriormente se desarrolló para su uso en vacas, cerdos, caballos, perros y gatos. Más tarde, el morantel y el oxantel fueron introducidos como compuestos nematocidas ¹²⁹. Estos AHs son activos contra las formas adultas y las L₄s de los NGI, pero no contra las formas inmaduras ni las larvas hipobióticas, y tampoco tienen acción sobre los cestodos ni trematodos. Su mecanismo de acción es similar al de los imidazotiazoles, ya que actúan como agonistas colinérgicos selectivos a través de la estimulación de los receptores colinérgicos nicotínicos de los nematodos. En definitiva, provocan una parálisis espástica de los parásitos ⁸⁷.
- El **closantel**, es activo frente a trematodos hepáticos adultos y *H. contortus*, sin embargo, tiene una eficacia limitada contra otros NGI. Pertenece al grupo de las salicilanilidas, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición del metabolismo energético desacoplando la fosforilación oxidativa mitocondrial del parásito ¹³⁰.
- El **nitroxinil** es un AH de espectro reducido perteneciente al grupo de los fenoles halogenados. Presenta actividad frente a algunos NGI como *Bunostomun* spp., *Haemonchus* spp. y *Oesophagostomum* spp ¹⁰⁹. Su mecanismo de acción es muy similar al de las salicilanilidas ya que interfiere en el metabolismo respiratorio de los helmintos, bloqueando la producción de energía por inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial del parásito ¹³¹.
- El **triclorfón** es un antiparasitario de la familia de los organofosforados que se ha utilizado en el control de infecciones de algunos NGI del ganado, así como

en el control de ectoparasitos e insectos ¹³². Se trata de un inhibidor de la acetilcolinesterasa, por lo que provoca una acumulación excesiva del neurotransmisor acetilcolina a nivel del espacio sináptico. Debido a esto, los parásitos mueren o quedan paralizados y son expulsados al exterior por el hospedador. Algunos estudios han demostrado que su administración produce efectos adversos en diferentes especies de animales, por lo que su uso es muy cuestionable en la actualidad ¹³³.

4. RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA

La RA se define como una pérdida hereditaria de sensibilidad a un AH en una población de parásitos que en el pasado fue susceptible al mismo ¹³⁴.

Se puede hablar de tres tipos de RA: resistencia cruzada, lateral y múltiple. La resistencia cruzada es el primer tipo de resistencia en el que una cepa de parásitos es capaz de tolerar las dosis terapéuticas de AHs que no están relacionados químicamente o que tienen un mecanismo de acción diferente. El segundo, es la resistencia lateral y es una condición en la que la RA se debe a la selección por otro AH que tiene un mecanismo de acción similar. Esto se ha observado entre los diferentes compuestos que forman la familia de los BZs. También se han descrito casos de cepas resistentes al levamisol que han desarrollado resistencia al morantel. El desarrollo de resistencia a dos o más AH con un mecanismo de acción similar o diferente, ya sea por selección de cada grupo de forma independiente o por resistencia lateral, es el tercer tipo de resistencia y se conoce como resistencia múltiple ¹³⁵.

Actualmente, los fármacos AHs son la base del control de las infecciones causadas por helmintos en animales, y probablemente seguirán siéndolo en el futuro debido a la falta general de vacunas antiparasitarias ¹³⁶. En los últimos 50 años, el control químico de los parásitos en los animales ha sido exitoso debido a la notable eficacia de los mismos, el buen margen de seguridad general, la naturaleza de amplio espectro y los bajos costes de los AHs. Lamentablemente, la aplicación de los fármacos AHs de forma intensiva ha dado lugar a un grave y dramático nivel de RA ¹³⁷. Este creciente desarrollo de la RA en los parásitos del ganado está amenazando la salud y la producción de los animales en todo el mundo.

4.1 Factores que favorecen la aparición de RA

La eficacia de los fármacos AHs modernos es de aproximadamente el 99% contra las cepas susceptibles. Los parásitos que sobreviven al tratamiento son eliminados en el medio ambiente contaminando los pastos, lo que conduce al desarrollo de generaciones de parásitos resistentes y por tanto de RA debido a la presión de selección ¹³⁶.

La tasa de desarrollo de la resistencia está influenciada por muchos factores que pueden englobarse en tres grupos: genéticos, biológicos y de manejo. Los factores genéticos se relacionan con la frecuencia y la perpetuación de los genotipos vinculados a la resistencia, mientras que los biológicos están relacionados con posibles cambios en la patogenia y/o morfología del parásito según sea resistente o susceptible. Los factores de manejo son considerados los más importantes ya que dependen directamente del ganadero y constituyen la base de los programas de gestión de la resistencia. Sin embargo, es necesario comprender los factores genéticos y biológicos para llegar a los procedimientos de manejo correctos ¹³⁸.

La **frecuencia del tratamiento** es uno de los factores más importantes asociado al desarrollo de la RA según diferentes autores ¹³⁹⁻¹⁴¹. Se ha observado que se desarrolla más rápidamente en las regiones donde los animales son desparasitados regularmente. Un corto intervalo de tiempo entre los tratamientos puede dar como resultado una presión de selección muy intensa sobre los parásitos. El principio fundamental de la selección de la RA es que el tratamiento ofrece a los parásitos supervivientes una ventaja reproductiva y de replicación sobre los susceptibles, durante unas 2 o 3 semanas después de la administración del AH ^{142,143}.

Otro factor importante es la **administración de una dosis incorrecta de AH**. Esto se debe principalmente a que la estimación visual del peso es el método más comúnmente aplicado para calcular la dosis de AH que se debe administrar a los animales, lo que a menudo es inapropiado y puede conducir a la subdosificación. También puede ocurrir que las pistolas dosificadoras no se calibren correctamente o que existan infecciones mixtas de parásitos con susceptibilidades distintas al fármaco ^{41,144}. Todo esto permite la supervivencia de nematodos tanto homocigóticos como

heterocigotos resistentes, eliminando solo a los homocigotos susceptibles y, contribuyendo por tanto, a la selección de cepas resistentes ¹⁴⁵

El **sistema de manejo y la época de tratamiento** también tienen una fuerte influencia sobre el desarrollo de la RA. La administración de tratamientos masivos profilácticos ha contribuido también al desarrollo generalizado de la RA ¹³⁶. Además, durante años, una práctica recomendada ha sido la administración de un AH y el traslado de los animales a zonas poco o nada contaminadas, lo que se conoce como “*dose and move system*”. Otra práctica común es la planificación de la administración del tratamiento en las estaciones secas para reducir la rápida reinfección de los animales. Sin embargo, estos sistemas de manejo, ejercen una fuerte presión de selección y contribuyen al desarrollo de resistencias, ya que la descendencia de los parásitos que resisten el tratamiento contamina los pastos “limpios” ¹⁴⁶.

Hay **otros factores** que también pueden contribuir al desarrollo de la RA, como el uso frecuente y continuado de un único fármaco, sin alternar con ningún otro de una familia química diferente ¹⁴⁶, la introducción de parásitos resistentes en el rebaño mediante la adquisición de animales de otras explotaciones, o el pastoreo de diferentes especies de animales en el mismo lugar, como por ejemplo cabras y ovejas. Sin embargo, hay autores que han descrito este último método de manejo como medida de prevención de la aparición de resistencia ^{138,142}. Otro factor podría ser la utilización de formulaciones de acción prolongada. Estos fármacos retrasan la reinfección ya que poseen una acción persistente, sin embargo, a medida que la concentración de AH disminuye hasta concentraciones subletales, los parásitos resistentes son capaces de sobrevivir dentro del hospedador, mientras que los susceptibles habrán sido eliminados, acelerando así el desarrollo de la RA ¹⁴⁷.

4.2 Mecanismos por los que se desarrolla la resistencia antihelmíntica y su detección a nivel molecular

La comprensión de los mecanismos por los que se desarrolla la RA puede ayudar a predecir mejor la rapidez con la que aparecerá en un rebaño, además de tratarse de una herramienta para estudiar la biología del parásito y las posibles dianas

terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos. A continuación, se describen los mecanismos por los que se desarrolla la RA en las familias de fármacos más utilizados, los BZs y las LMs.

4.2.1 Resistencia a los benzimidazoles

El mecanismo de resistencia más estudiado y conocido es el de los BZs. Este, se ha vinculado definitivamente a mutaciones en el gen que codifica el isotipo 1 de la β -tubulina de los nematodos. Según numerosos estudios, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *del inglés single nucleotide polymorfism*) en los codones 167, 198 y 200 de este son los responsables de causar la resistencia ^{136,148}. La mutación en el codón 200 se ha descrito como la más frecuente, seguido de la mutación en el codón 167 y por último, en el codón 198 ^{136,148-150}.

Dichos cambios dan lugar a alteraciones de las secuencias de aminoácidos que posteriormente, cambian la estructura tridimensional de la proteína. Se cree que los cambios en la estructura de la proteína inhiben la unión o disminuyen la afinidad de las moléculas de BZ a los sitios objeto de unión en la β -tubulina ¹⁵¹.

Los codones 167 y 200 comparten el mismo SNP, una sustitución de la segunda timina por adenina (TTC \rightarrow TAC), que da lugar a las sustituciones de aminoácidos de fenilalanina a tirosina ^{152,153}. En el codón 167, también se ha observado una sustitución de aminoácidos de fenilalanina a histidina ¹⁴⁸. La mutación en el codón 198 se debe a la sustitución de la adenina por una citosina (GAA \rightarrow GCA), lo que da lugar a una sustitución de ácido glutámico a alanina ¹⁵³, aunque recientemente, también se han encontrado otras sustituciones en el codón 198 que producen cambios de un ácido glutámico a leucina ^{154,155}, valina, lisina o isoleucina ¹⁵⁴.

Otros estudios han sugerido la implicación del gen que codifica el isotipo 2 de la β -tubulina en *H. contortus*, en la resistencia a los BZs ^{152,156}. Sin embargo, los datos que apoyan esta afirmación son escasos y poco concluyentes ¹⁵⁷.

Estas mutaciones son capaces de detectarse mediante el uso de técnicas moleculares. La mayoría de estas técnicas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*del inglés polymerase chain reaction*), entre las que se pueden

encontrar distintos tipos como la PCR alelo específica o AS-PCR (del inglés *allele specific-PCR*) y la PCR con análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o PCR-RFLP (del inglés *PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism*), que permiten detectar la presencia de SNPs, y la PCR en tiempo real (qPCR, quantitative PCR), que permite su cuantificación. Cabe destacar también la técnica de pirosecuenciación como una estrategia de secuenciación que permite la cuantificación de SNPs alelo-específicos de manera precisa, reproducible y de alto rendimiento ¹⁵⁸. Esta tecnología se basa en la detección cuantitativa de señales luminosas que se generan como resultado de una reacción multienzimática. Tras la adición de nucleótidos al cebador de secuenciación unido a la cadena complementaria de ADN diana, se libera pirofosfato en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótidos incorporados. El pirofosfato se convierte entonces en ATP, que finalmente es utilizado por la luciferasa para producir una señal luminosa que es detectada por un dispositivo de cámara de carga acoplada. Mediante la adición de los cuatro nucleótidos posibles, de uno en uno, en una secuencia predeterminada, se determina la secuencia de nucleótidos de la plantilla. La luz producida en la reacción catalizada por la luciferasa es detectada por una cámara y analizada en un pirograma ¹⁵⁹.

Todas estas técnicas moleculares han experimentado una importancia creciente en el estudio de la RA en los NGI pues se tratan de pruebas muy específicas que además permiten detectar bajos niveles de resistencia ¹⁵⁰. Su aplicación permite el diagnóstico temprano, rápido y preciso de la resistencia ¹⁶⁰. Sin bien es cierto que su diseño y utilización requiere el conocimiento y comprensión previos de la naturaleza molecular de las distintas resistencias, lo que en muchos casos no se tiene del todo claro ¹⁵⁹.

4.2.2 Resistencia a las lactonas macrocíclicas

Los mecanismos moleculares que determinan la resistencia a las LMs siguen siendo un tema de estudio en la investigación parasitológica veterinaria ¹⁵⁷. Como se comentó anteriormente, las LMs actúan como agonistas sobre la unidad α de los receptores GluCl, por lo que la resistencia ocurre por modificaciones en las subunidades del receptor GluCl y/o por la mayor expresión de una proteína de

membrana, la P-gp, impidiendo que el fármaco alcance las concentraciones activas en los receptores GluCl de los parásitos resistentes¹³⁶. Los resultados de algunos estudios *in vivo* han demostrado que aquellos parásitos resistentes a las avermectinas lo son igualmente a las milbemicinas, en particular a la moxidectina, por ser fármacos relacionados químicamente que tienen un mecanismo de acción similar¹⁶¹.

Blackhall *et al.*¹⁶² observaron un aumento de la frecuencia de un alelo del gen putativo codificante de la subunidad α de los canales GluCl en una cepa de *H. contortus* resistente a la ivermectina y moxidectina, por lo que sugirieron que la mutación de este gen inducía la resistencia a las LMs. Estudios posteriores, asociaron la resistencia a esta clase de fármacos con una sustitución de leucina por fenilalanina en el codón 256 de dicho gen^{163,164}. Otros estudios han observado que una sustitución aminoacídica de una alanina por una valina en la posición 169 de la subunidad α del canal GluCl codificado por el gen *Hco-glc-5*, se asoció con una reducida sensibilidad a la ivermectina y moxidectina¹⁰⁵.

En el nematodo de vida libre *C. elegans*, los genes *avr-14*, *avr-15* y *glc-1* codifican para tres subunidades α de los receptores GluCl del músculo faríngeo y algunas neuronas extrafaríngeas y los genes *unc-7* y *unc-9* codifican las innexinas, subunidades de las uniones gap de los invertebrados que están presentes entre neuronas extrafaríngeas y las células musculares faríngeas¹⁶⁵. Dent *et al.*¹⁶⁵ demostraron que la mutación simultánea en los genes *avr-14*, *avr-15* y *glc-1* se traduce en resistencia a la ivermectina, mientras que las cepas con mutaciones en sólo dos de los tres genes de la subunidad receptora apenas confieren resistencia. Por otro lado, mutaciones en los genes *unc-7* y *unc-9* llevan a que la resistencia se limite sólo a las neuronas con receptores GluCl y no al músculo faríngeo¹⁶¹.

También se ha descrito que la resistencia a las LMs está relacionada con la disminución de la permeabilidad de la cutícula de los nematodos a estos fármacos, siendo la expresión de los genes *Dyf* la responsable de la captación, de tal manera que la mutación de algunos de ellos, como el *osm-1*, producen en los parásitos una permeabilidad menor al fármaco, confiriéndoles resistencia¹⁶¹.

Por otra parte, también cabe destacar el papel de la P-gp en el desarrollo de la resistencia a las LMs en *H. contortus*¹⁶⁶. Diferentes estudios han mostrado la existencia de cuatro genes con al menos 40-50 alelos diferentes en el gen que codifica la P-gp en *H. contortus* y su relación con la resistencia^{141,167,168}. Al mismo tiempo, la exposición de larvas y adultos de *H. contortus* a LMs condujo a la sobreexpresión de la P-gp *in vivo*⁹⁶, mientras que la expresión de la P-gp parece aumentar en las cepas resistentes. Diversos estudios han demostrado que varios inhibidores de la P-gp pueden aumentar la sensibilidad de *H. contortus* a esta familia de fármacos, tanto *in vitro*¹⁶⁹⁻¹⁷¹ como *in vivo*¹⁶⁶. Según estos hallazgos, Lifschitz *et al.*¹⁷² concluyeron que los inhibidores de la P-gp pueden aumentar la eficacia de las LMs contra cepas de *H. contortus* resistentes en ovejas.

También se han descrito mutaciones en los genes que codifican para el receptor GABA en cepas de *H. contortus* y *C. elegans*^{99,173,174}. Otros autores como Williamson *et al.*¹⁷⁵, no lograron correlacionar la resistencia a las LMs con mutaciones en los receptores GABA ni en los canales de GluCl.

En general, hay pruebas de que existen múltiples mecanismos para desarrollar una resistencia a la ivermectina¹⁷⁶, pero aun así sigue siendo necesario llevar a cabo más investigaciones en este campo.

4.3 Estado actual de la resistencia antihelmíntica

Actualmente, el problema de la RA está presente en la ganadería de todo el mundo, aunque varía según las distintas áreas y especies de animales¹³⁶, encontrándose más extendido en pequeños rumiantes que en grandes, especialmente en ovejas¹⁷⁷.

A nivel europeo, las especies de NGI más comúnmente asociadas a la resistencia frente a los BZs y las LMs son *H. contortus* y *T. circumcincta*, aunque también se encuentra en otras especies como *Trichostrongylus*, *Cooperia* y *Nematodirus*^{178,179}. Rose Vineer *et al.*¹⁷⁹ analizaron un total de 197 publicaciones con datos disponibles sobre RA en NGI de 22 países europeos, junto con datos no publicados previamente, durante un periodo comprendido desde 1980 a 2020. El

estudio confirmó una tendencia al aumento de la RA con el tiempo para todas las clases de AHs, siendo los BZs el grupo con mayor prevalencia de resistencia en Europa, con un 86% de media, seguido de las LMs (a excepción de la moxidectina) con un 52%, levamisol con un 48% y moxidectina con un 21%.

En países como Reino Unido ¹⁸⁰⁻¹⁸² e Irlanda ¹⁸³, se ha observado la presencia de la RA a los BZs en el 98 y 100% de las explotaciones ovinas examinadas, respectivamente. Otros países como República Checa ¹⁸⁴ y Eslovaquia ¹⁸⁵, también mostraron niveles muy elevados con porcentajes del 98 y 100%, respectivamente.

A pesar de que los estudios muestran una menor prevalencia de la RA en Europa que en otras regiones del mundo, se han notificado casos de multiresistencia tanto en *H. contortus*, como en *T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp. en un numerosos países ^{186,187}.

También existen algunas publicaciones con casos de RA al monepantel y al derquantel en Reino Unido, Francia y Países Bajos, los dos AHs registrados más recientemente ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. En el caso del monepantel se ha descrito principalmente en *H. contortus*, aunque también se ha identificado en *Trichostrongylus* spp., *T. circumcincta* y *C. curticei* ¹⁹¹.

Si nos centramos en España, la mayoría de los estudios sobre RA se han llevado a cabo en las CCAA de Castilla y León, Galicia y Aragón. En Castilla y León, los datos recopilados mostraron que desde el año 1999 hasta el año 2011 los niveles de resistencia a los BZs y a las LMs se mantuvieron relativamente estables en los rebaños, con valores en torno al 13 y 27%, respectivamente, mientras que los niveles de resistencia al levamisol aumentaron un 20%, hasta alcanzar el 59% ^{192,193}. Por otro lado, el último estudio llevado a cabo entre 2015 y 2016 en esta Comunidad evidencia que la resistencia a los BZs se ha incrementado hasta el 36% ¹⁹⁴. En Galicia, los últimos datos recogidos por Díez-Baños *et al.* ¹⁹⁵ mostraron la presencia de resistencia a BZs en un 18% de los rebaños, mientras que la resistencia a LMs sólo se detectó en un 3% de las explotaciones. Además, ninguna de las 72 explotaciones muestreadas presentaba resistencia a más de un AH. En Aragón, Calvete *et al.* ¹⁹⁶ estimaron que el 11% de los rebaños muestreados en la zona presentaban poblaciones de parásitos resistentes a

los BZs, aunque se sospechaba de la presencia de cepas de parásitos resistentes a los BZs en el 98% de la muestra analizada.

En el resto del mundo la resistencia también se encuentra muy extendida. En Estados Unidos, *H. contortus* es la especie más identificada en los estudios de resistencia y los BZs son el grupo de AHs con resistencia más prevalente, con valores por encima del 90% en todos los casos, seguido de la ivermectina, con valores que varían desde el 35 al 95%, según la zona ^{137,197,198}. En el caso de la moxidectina, aunque la incidencia de la resistencia es menor que en el caso de la ivermectina, se ha visto un importante incremento en los últimos años, con valores de cerca del 50% en algunas zonas ¹³⁷. En Canadá también se ha observado que la resistencia a la ivermectina y a los BZs está muy extendida en *H. contortus*, aunque no tanto como en Estados Unidos ¹⁹⁹. Otros países de América como Brasil, Argentina, México y Costa Rica también presentan datos muy similares a sus países vecinos, con una elevada presencia de resistencia a BZs e ivermectina ²⁰⁰⁻²⁰⁶. Cabe destacar que en la mayoría de estos estudios aparecían casos de resistencia a más de un fármaco AH.

En el caso del continente africano, se han notificado casos de RA en al menos 14 países. La mayoría de los estudios procedían de Kenia y Sudáfrica e implicaban a *H. contortus* ⁷². Algunos de los estudios más recientes también apuntan a la presencia de cepas resistentes principalmente a los BZs ²⁰⁷ y a la ivermectina ²⁰⁸.

En zonas como Australia, los niveles de prevalencia de resistencia son muy elevados, especialmente para los BZs y el levamisol en *T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp ^{72,209}. La resistencia a la avermectina también ha aumentado considerablemente los últimos años en *T. circumcincta* y *H. contortus* llegando incluso a valores del 80% en algunas zonas. En Nueva Zelanda, los últimos estudios llevados a cabo, hace más de 10 años, pusieron de manifiesto que la RA es altamente prevalente, aunque permanece en niveles inferiores a los observados en climas más cálidos ⁷².

A parte de en Europa, también se han registrado fallos de eficacia frente al último fármaco registrado en el mercado, el monepantel, en diferentes zonas del mundo, incluyendo Nueva Zelanda, Australia y Sudamérica ²¹⁰⁻²¹⁴.

4.4 Uso sostenible de fármacos antihelmínticos

Los dos enfoques clave que utilizan actualmente los productores para hacer frente a la resistencia a los AH son en primer lugar, evitar la introducción de parásitos resistentes en las explotaciones y en segundo lugar, frenar el desarrollo de la resistencia. Con respecto al primero, se pueden utilizar medidas de cuarentena estrictas para limitar el riesgo de introducir parásitos resistentes. Sin embargo, conseguir conservar la eficacia de los fármacos actuales y futuros debe equilibrarse con la capacidad de mantener altos niveles de producción y bienestar animal.

Uno de los enfoques más actuales en los que se ha centrado la investigación y el debate es el de mantener una población de parásitos en refugios (no expuesta a los fármacos), con el fin de mantener la susceptibilidad tanto fenotípica como genotípica^{178,215}.

En el contexto de la RA, un refugio se refiere a las poblaciones que no están expuestas al tratamiento AH, bien de la denominada “infrapoblación” o los estadios parasitarios dentro del hospedador, o bien de la “suprapoblación” o los estadios de vida libre en los pastos. Estos parásitos completan su ciclo vital y transmiten los alelos susceptibles a la siguiente generación parasitaria, manteniendo así la susceptibilidad al fármaco²¹⁶.

Desde el año 2001, el control de los parásitos del ganado basado en los refugios ha ido ganando aceptación. Van Wyk²¹⁷ propuso que los refugios se incorporaran más ampliamente al uso racional de los AHs como medio para frenar la propagación de la RA. Al minimizar la exposición al fármaco, las estrategias de control basadas en refugios pretenden conservar los alelos susceptibles dentro de la población de parásitos. Si una proporción de una población no se expone al fármaco, los estados pre-parasitarios derivados de ellos aportarán genotipos susceptibles al pasto, por lo tanto, la mezcla resultante de genotipos resistentes y susceptibles debería permitir la posibilidad de cruces y/o diluir la frecuencia de genotipos resistentes dentro de una población²¹⁶.

Aunque hay varios factores parasitológicos y de gestión que pueden influir en la tasa de desarrollo de la resistencia, como la frecuencia de los tratamientos y la

subdosificación, Van Wyk ²¹⁷ sugirió que la proporción de la población de parásitos en los refugios podría ser el factor más importante que determina la tasa de desarrollo de la resistencia y debería de tenerse en cuenta, por encima de todo, durante el desarrollo y la aplicación de cualquier estrategia de control.

Aunque esta estrategia ha ganado cada vez más aceptación en los últimos años, siguen existiendo importantes lagunas de conocimiento. La RA tiene una base genética y puede ser preadaptativa o espontánea, de modo que los alelos que confieren resistencia pueden estar presentes en las poblaciones antes de la exposición al fármaco, o pueden aparecer de nuevo durante el período de exposición al fármaco ²¹⁸.

Múltiples estudios llevados a cabo en diferentes continentes han demostrado repetidamente que la resistencia a los BZs no es reversible, ya que la resistencia fenotípica seguía siendo alta muchos años después de dejar el tratamiento ²¹⁹⁻²²². Sin embargo en otros casos, se ha observado que el uso regular del levamisol para controlar los NGI resistentes a los BZs condujo a una reducción del nivel de resistencia a los mismos en *O. circumcincta* después de cuatro años ^{223,224} y en *T. colubriformis* después de 8 años ²²⁵. Sin embargo, no se consiguió alcanzar una completa susceptibilidad y la reintroducción de los BZs condujo a una reaparición de la resistencia muy rápida, alcanzando los niveles anteriores. Por el contrario, un estudio de 5 años llevado a cabo en Nueva Zelanda, basado en el control de los refugios y la combinación de AHs, demostró una reversión parcial de la susceptibilidad para el levamisol y la ivermectina, aunque no para los BZs, en poblaciones de *T. circumcincta* resistentes a múltiples fármacos ²²⁶.

Por lo tanto, para la mayoría de los fines prácticos, una vez que se establece una resistencia sustancial a los BZs, esta es efectivamente permanente ²¹⁶.

Tratamiento selectivo dirigido

Hoy en día, una de las recomendaciones de buenas prácticas de manejo para el control de NGI basada en los refugios es el tratamiento selectivo dirigido o TST (del inglés *target selective treatment*). Esto se basa en el tratamiento de una sola proporción de animales, en lugar de todo el grupo, dejando una parte de la población

de parásitos sin tratar y, por tanto, libre de la presión de selección aplicada por la exposición al fármaco.

Uno de los principales retos del TST, y de otros métodos basados en los refugios, es decidir qué animales se van a tratar. Para ello, hay que tener en cuenta que normalmente unos pocos animales son los que contienen la mayor parte de los NGI en el rebaño. Para detectarlos existen una serie de indicadores potenciales como el aumento del recuento de huevos fecales, la disminución de la producción de leche o la reducción del aumento de peso vivo. También existen diferentes sistemas de puntuación, como el método FAMACHA® o la valoración de la condición corporal^{227,228}. Sin embargo, la adopción de un enfoque específico de TST depende de aspectos prácticos de la granja en cuestión, ya que cualquier modificación de la práctica estándar tiene que ser fácil de llevar a cabo y rentable para el ganadero.

Por ejemplo, en las zonas endémicas de *H. contortus*, se ha utilizado ampliamente una medida relativamente sencilla denominada FAMACHA®, en la que se evalúa el color de la conjuntiva ocular en una escala numérica del 1 al 5, siendo 1 rojiza y 5 pálida, indicando esta última la presencia de anemia (Fig. 8)²²⁹. El tratamiento solo se recomienda cuando se encuentren en una escala de 4 o 5. En el caso de encontrarse en 3, se recomienda la desparasitación solo si son animales jóvenes, si presentan mala condición corporal o si presentan algún otro tipo de enfermedad. La eficacia del uso de este sistema de puntuación para supervisar la salud de los animales infectados y mantener los refugios en el campo se ha demostrado en diferentes estudios de campo^{230,231}.

Algunos autores han encontrado una buena correlación entre la cantidad de parásitos adultos en el abomaso, el recuento de huevos fecales, hematocrito, hemoglobina y el método de puntuación FAMACHA®²³²⁻²³⁴. El uso de este método permite disminuir el número de tratamientos AHs a aplicar a los animales y por lo tanto, reducir el gasto económico del ganadero. Además, se trata de una herramienta barata y fácil de utilizar y conseguir. Sin embargo, este método no puede aplicarse en las especies de parásitos no hematófagos²²⁸.

En las regiones en las que existe un predominio de *T. circumcincta*, se ha evidenciado que un aumento de peso inferior al esperado es un indicador fiable de las ovejas que requieren tratamiento ²³⁵. Aunque esta estrategia TST basada en la ganancia de peso como índice de rendimiento puede ser semiautomatizada, utilizando básculas e identificación electrónica, se necesitan más estudios para desarrollar herramientas de selección que sean fáciles de aplicar y económicamente atractivas en diferentes contextos.

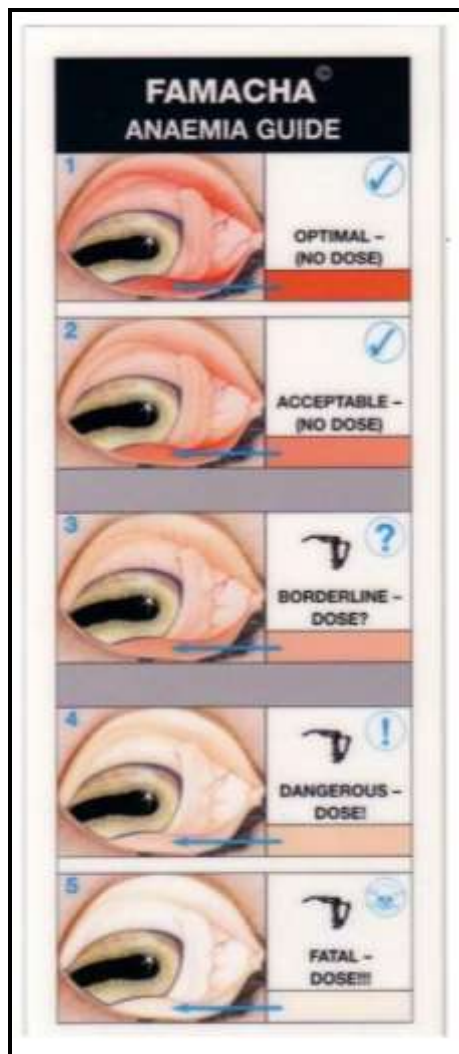


Figura 8. Tarjeta de puntuación FAMACHA[®]. Guía para la evaluación del color de la conjuntiva ocular en los animales en una escala del 1 al 5, junto con la recomendación o no, de la administración de tratamiento antihelmíntico. Tomada de Şahin *et al.* ²³⁴.

También es necesario seguir trabajando para garantizar que las estrategias de TST utilicen umbrales de tratamiento adecuados para preservar la producción a la vez que se minimiza el uso de AHs ²¹⁶. En el futuro, algunas herramientas para la selección

de animales podrían ser la supervisión automatizada del rendimiento productivo o el comportamiento de los animales ²³⁶.

Combinación de fármacos antihelmínticos

Se recomienda que al utilizar el TST, se emplee también una combinación de AHs para maximizar el nivel de eficacia del tratamiento ²³⁷.

En los rumiantes, esta estrategia de combinación de fármacos ha conseguido mejorar la eficacia de los mismos, disminuir la toxicidad y retrasar el desarrollo de resistencia ^{238,239}. Los datos disponibles demuestran que el uso de combinaciones de fármacos, especialmente cuando se introducen antes de que se desarrolle la resistencia a todos los componentes activos incluidos en la combinación, retrasa la aparición de la resistencia ^{238,240–242}.

En algunos países se comercializan formulaciones farmacéuticas que combinan dos o tres entidades químicas diferentes. Normalmente estas pertenecen a los grupos químicos de los BZs, las LMs o de los imidazotiazoles, aunque como se describía anteriormente, existen también otras combinaciones con compuestos más nuevos como el derquantel con la abamectina. El caso del monepantel sin embargo, se comercializa solo en la mayoría de los países salvo Australia y Nueva Zelanda, en donde también se encuentra en combinación con la abamectina.

Las poblaciones iniciales de NGI son genéticamente diversas ²⁴³, sin embargo, cabe señalar que cuanto mayor sea la diversidad genética dentro de la población, mayor será la probabilidad de que aparezcan alelos resistentes. Por lo que la combinación de fármacos se basa en el hecho de que los parásitos individuales pueden tener un menor grado de resistencia a una formulación de múltiples componentes (cada producto químico con un modo de acción/resistencia diferente) en comparación con el observado cuando se utiliza una única molécula antihelmíntica (Fig. 9). El bajo número resultante de parásitos supervivientes con genotipos resistentes se diluiría en la población de nematodos en los refugios, y los parásitos resistentes tardarían más en ser predominantes. Por lo que este tipo de tratamiento proporciona una ventaja de supervivencia a los nematodos que portan los alelos de resistencia ²⁴⁴.

Diferentes estudios indican que este tipo de tratamientos son eficaces para frenar el desarrollo de la RA incluso cuando la resistencia inicial a uno de los componentes de la combinación es elevada ^{240,241,245}. No obstante, hay que tener en cuenta que en ausencia de un nivel adecuado de refugio, el uso de combinaciones tiene el potencial de seleccionar hacia el desarrollo de múltiples parásitos resistentes a los fármacos, reduciendo la gama de opciones de fármacos AHs ²⁴⁶. También puede ocurrir que las poblaciones de parásitos bajo refugio sean elevadas, es decir, que los pastos se encuentren muy contaminados, y por tanto, la reinfección de los animales será también elevada y su rendimiento se verá afectado negativamente. En este caso, la frecuencia de los tratamientos AHs (presión de selección) deberá aumentarse, favoreciendo el desarrollo de resistencias. Lograr un correcto equilibrio entre las poblaciones de nematodos en el refugio, la carga de parásitos en los animales de pastoreo y su rendimiento productivo es un reto complejo ²⁴⁷.

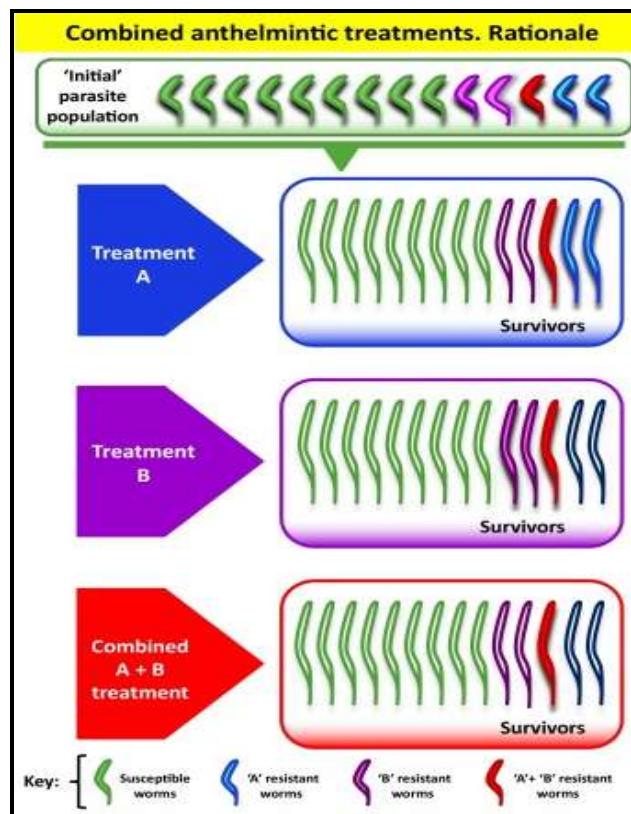


Figura 9. Justificación del uso de tratamientos antihelmínticos combinados. La población inicial incluye parásitos susceptibles a los fármacos denominados A y B (parásitos de color verde), parásitos resistentes al fármaco A (color púrpura), al fármaco B (color azul) y, en menor frecuencia, a ambos fármacos (color rojo). Teóricamente, los parásitos resistentes al fármaco A y los multirresistentes (a los fármacos A y B) sobrevivirán tras el tratamiento con el fármaco A, contribuyendo a la siguiente generación. Sin embargo, cuando los fármacos A y B se utilizan en combinación, sólo sobreviviría una baja proporción de parásitos resistentes múltiples. Modificado de Canton *et al.* ²⁴².

5. BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

En la actualidad la administración de fármacos AHs representa la estrategia básica para el tratamiento de las nematodosis gastrointestinales en los animales ^{31,137}. Se han propuesto diversos métodos para el control de este tipo de infecciones que no dependen exclusivamente del uso de fármacos, sin embargo, cuando el nivel de infección es elevado, es necesario realizar un tratamiento AH eficaz y rápido ²⁴⁸.

Entre los diferentes métodos de control se encuentran la adecuada gestión del pastoreo, el control biológico de los pastos, la suplementación nutricional y los enfoques genéticos mediante la cría selectiva ^{137,246,249}. Los agentes de control biológico están ganando cada vez más importancia, y aunque parecen mostrar resultados prometedores, necesitan llevarse a cabo aún más investigaciones para poder implementarse. Entre ellos podemos encontrar el uso de hongos nematófagos, los escarabajos peloteros, las lombrices de tierra, los nematodos depredadores y los ácaros nematófagos ²⁵⁰. Por otro lado, el desarrollo de vacunas también es un campo prometedor objeto de numerosos estudios. Países como Australia, Sudáfrica y Reino Unido ya disponen de vacunas frente a *H. contortus*. No obstante, hasta la fecha no contamos con ninguna comercializada en nuestro país ^{74,251}. Otro enfoque en auge que está siendo objeto de numerosos estudios es la explotación de los compuestos bioactivos presentes en las plantas. Además de complementar la acción de los fármacos AHs y reducir la presión de selección que produce la resistencia, también tienen la ventaja de la disponibilidad de recursos, la falta actual de resistencia a dichos compuestos y el bajo coste en comparación con algunos AH ²⁵².

Aunque todos estos métodos son muy valiosos y necesarios, la quimioterapia sigue siendo el pilar para el control de todas las nematodosis gastrointestinales. Aun así, no hay que olvidarse de que ningún método de control es sostenible por sí solo, y por lo tanto, la aplicación de los fármacos AHs debe realizarse en combinación con estrategias de control alternativas, garantizando al mismo tiempo que la tasa de selección de la resistencia sea mínima ^{31,137,252}.

5.1 Métodos de determinación de la eficacia antihelmíntica de compuestos.

El proceso de descubrimiento de nuevos fármacos AHs se ha basado mayoritariamente en la utilización de ensayos fenotípicos, es decir, en donde se observa el efecto que ha producido el compuesto sobre el parásito. Sin embargo, cada vez existen más intentos de utilizar nuevos sistemas para el descubrimiento de fármacos como el cribado basado en el mecanismo de acción, la aplicación de técnicas genómicas y moleculares para la identificación de dianas farmacológicas, y el desarrollo de nuevos tipos de ensayos basados en el análisis de imágenes para facilitar el cribado de alto rendimiento ⁷⁴. A continuación se describen algunos de los métodos disponibles para determinar la eficacia tanto de los AHs comerciales como de los posibles nuevos compuestos.

5.1.1. *Ensayos in vivo para determinar la eficacia antihelmíntica*

En este contexto, los primeros intentos sistemáticos de descubrimiento de nuevos AHs se basaron en ensayos que utilizaban animales infectados. De esta manera, dichos modelos tuvieron un éxito innegable y llevaron al descubrimiento de fármacos como el levamisol ²⁵³, el pirantel ¹²⁹, el ciclodepsipéptido PF1022A ²⁵⁴ y la ivermectina ⁹⁰.

Las primeras bases publicadas para la determinación de la posible eficacia antihelmíntica de los compuestos a través de **ensayos de eficacia controlada** o CET (del inglés *controlled efficacy test*), fueron establecidas por La Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria o WAAVP (del inglés, *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*) en 1982 ²⁵⁵. Años más tarde, Wood *et al.* ²⁵⁶ fijaron nuevas directrices y estandarizaron la técnica completamente. Para llevar a cabo este ensayo, es necesario medir la carga de NGI presente en el abomaso e intestino del animal sacrificado tras haber sido sometido a un tratamiento AH. El ensayo es capaz de determinar la eficacia antihelmíntica de los compuestos frente a los distintos estadios del parásito según el momento en el que se lleve a cabo el sacrificio. En un inicio, Powers *et al.* ²⁵⁵ reflejaban la opinión de que una eficacia del 90% o más era muy buena, mientras que entre el 80 y el 90% era considerado

moderadamente eficaz. Desde entonces, se han desarrollado AHs que alcanzan una eficacia superior al 98%.

De esta manera, el CET ha sido estandarizado como método para determinar la presencia o ausencia de resistencia frente a cualquier tipo de fármaco AH, tanto a nivel de campo como de investigación, considerándose como el método más eficaz a la hora de determinar la eficacia de un fármaco, sin embargo, se trata de una prueba muy costosa en términos de tiempo y dinero ²⁵⁷. En el caso de sospecha de RA, esta se confirma cuando la reducción en la media geométrica del número de parásitos es inferior al 90%, o el recuento de los vermes que sobreviven al tratamiento es superior a 1.000 ²⁵⁸.

Otro tipo de prueba que requiere la utilización de animales vivos es la **prueba de reducción del recuento de huevos fecales** o FERCT (del inglés *Faecal Egg Count Reduction Test*). Se trata de una prueba sencilla y fácil de realizar, que proporciona una estimación de la eficacia de un AH mediante la comparación del recuento de huevos fecales de un grupo de animales antes y después del tratamiento. Por lo general, se incluye un grupo no tratado para controlar cualquier cambio que se produzca en los recuentos de huevos de nematodos durante el período de la prueba ²⁵⁹.

Una de las limitaciones importantes del FERCT es que los resultados de la prueba pueden no estimar la eficacia de los AHs con precisión porque la producción de huevos de nematodos no siempre se correlaciona bien con el número real de parásitos adultos presente en el animal. Se ha encontrado una buena correlación entre los recuentos de huevos en heces y los recuentos de adultos para *H. contortus*, pero no para *T. colubriformis* ²⁶⁰ o *T. circumcincta* ²⁶¹. Los recuentos de huevos de *Nematodirus* spp. suelen ser bajos y guardan poca relación con la carga real de parásitos ²⁶².

Por lo tanto, la precisión de esta técnica por tanto, se ve influenciada por el método de recuento de huevos en heces utilizado y por el nivel de excreción de los mismos ²⁶³. Algunos autores recomiendan la utilización de técnicas de recuento de huevos fecales más sensibles, como el caso del Mini-flotac ²⁶⁴, en lugar de la técnica de McMaster modificada, inicialmente recomendada ²⁵⁹.

Además, hay que tener en cuenta, que cuando se trata de infecciones mixtas el FERCT por sí solo puede no proporcionar suficiente información para una

interpretación correcta de los resultados, ya que los huevos de NGI son todos iguales (con la excepción de *Nematodirus* spp), por lo que es necesario realizar coprocultivos para la diferenciación de las L₃s de los diferentes géneros. Sin embargo, las condiciones en las que se mantiene el coprocultivo pueden favorecer el desarrollo de unas especies sobre otras ²⁵⁸. Además, especies con un elevado potencial biótico, como por ejemplo *H. contortus*, pueden ejercer una influencia desproporcionada en los resultados. Se trata de la técnica más utilizada en la detección de RA ²⁶³, a pesar de ser uno de las primeras en describirse ²⁵⁸. Está completamente estandarizada y puede usarse en la detección de resistencia frente a todos los tipos de AHs y especies de tricostrongídeos. Se considera que la resistencia está presente cuando el porcentaje de reducción del número de huevos fecales está por debajo del 95% y el límite inferior para su intervalo de confianza del 95% es menor o igual al 90%. En el caso de que solo se cumpla uno de estos dos criterios, la resistencia se sospecha y si no se cumple ninguno el fármaco se considera eficaz ²⁵⁹.

Según el tipo de AH utilizado en el tratamiento se recomienda una fecha diferente para realizar el recuento de huevos. En el caso de los BZs, es recomendable esperar al menos 10 días ¹³⁶, mientras que cuando se emplean tetrahidropirimidinas o imidazotiazoles se recomienda realizarlo el día 7 tras la administración del fármaco ²⁶⁵. En el caso de las LMs, el tiempo recomendado es entre 14 y 17 días ²²².

Entre los inconvenientes del FECRT se encuentra su baja sensibilidad, pues no es capaz de detectar la RA cuando la proporción de individuos resistentes en la población está por debajo del 25% ²⁵⁹.

Este tipo de técnicas basadas en el uso de animales infectados son capaces de establecer la eficacia de cualquier compuesto, independientemente de su mecanismo de acción, mientras que los métodos que se van a explicar a continuación, denominados como métodos *in vitro*, tienen más probabilidades de pasar por alto compuestos sin fenotipos muy manifiestos ²⁶⁶.

5.1.2. Ensayos *in vitro* para determinar la eficacia antihelmíntica

En los últimos años, las estrategias de la química medicinal cambiaron y condujeron a la síntesis rutinaria de cantidades bastante pequeñas de compuestos (<1

mg). Este hecho coincidió con la introducción y aceptación general del principio de las "Tres R" (reducir, reciclar y reutilizar) para reducir, perfeccionar y sustituir las pruebas que utilizan animales ^{267,268}, así como con la aparición de fuertes presiones económicas para reducir el gasto económico. En consecuencia, los ensayos en animales pasaron a utilizarse únicamente para determinar la actividad antihelmíntica de los compuestos más prometedores, dando paso al desarrollo de sistemas de cribado fenotípico que utilizan parásitos mantenidos bajo condiciones de laboratorio y posteriormente, a sistemas de cribado basados en el mecanismo de acción. Los sistemas de cribado fenotípico se basan en la medición de la viabilidad y/o el comportamiento de los parásitos vivos *in vitro* ²⁶⁹.

Dado que no se dispone de sistemas que permitan el cultivo de parásitos adultos (el principal objetivo para el control quimioterapéutico de los parásitos tricostrongílicos), se han investigado varias estrategias que emplean el cultivo *in vitro* de las fases larvianas; fácilmente disponibles en especies de nematodos patógenos y en modelos de vida libre ²⁷⁰. De hecho, el primer AH verdaderamente seguro y de amplio espectro, el tiabendazol, se descubrió en un ensayo con larvas de tricostrongílicos ⁷⁵. El monepantel también fue descubierto a través de ensayos que utilizaban larvas de *H. contortus* y *T. colubriformis* ¹¹⁵.

De esta manera, los ensayos fenotípicos que utilizan estadios parasitarios han sido una herramienta muy útil en el cribado de cantidades considerables de compuestos. Sin embargo, la falta de estandarización de estas técnicas hace que el número de ensayos que se pueden encontrar sea elevado, ya que cada investigador establece sus propios criterios a la hora de llevarlo a cabo. Siendo así, podremos encontrar un gran número de ensayos que permiten evaluar el efecto de los compuestos sobre diferentes estadios del parásito, desde huevo hasta la forma adulta. Uno de los principales inconvenientes de este tipo de ensayos es la necesidad del mantenimiento de animales infectados de forma experimental para la obtención de las diferentes fases parasitarias.

Como se verá a continuación, algunos de estos ensayos *in vitro* también han sido puestos a punto como técnicas para la detección de la RA, utilizando en este caso fármacos comerciales.

El **ensayo de eclosión de huevos** o EHT (del inglés, *egg hatch test*) evalúa la capacidad de los compuestos para actuar sobre la embrionación y eclosión de los huevos. Inicialmente se desarrolló utilizando huevos aislados de rumiantes infectados por NGI con el fin de detectar la presencia de resistencia a los BZs.

El EHT fue descrito por primera vez por Le Jambre (1976)²⁷¹, sin embargo, fue la WAAVP quien describió el primer protocolo estandarizado²⁵⁹.

En este ensayo los huevos de los NGI no desarrollados se incuban con los compuestos que se desea cribar. Tras el periodo de incubación, se determina el porcentaje de huevos que eclosionan (o, por el contrario, que mueren) en cada pocillo, corrigiéndose con la mortalidad natural de los pocillos control y se determina la capacidad ovicida de cada compuesto.

En los últimos años, este ensayo ha sido utilizado por numerosos investigadores con el fin de evaluar la posible actividad antihelmíntica de diferentes colecciones de compuestos, como derivados de BZs²⁷², productos de plantas²⁷³⁻²⁷⁵ o compuestos previamente seleccionados en cribados de quimiotecas, como la benzoamida BLK127 y la bencenosulfonamida HBK4²⁷⁶. Generalmente *H. contortus*, *T. circumcincta* y *Trychostrongylus* spp. son los NGI de rumiantes más utilizados para ello.

El EHT también ha servido para determinar la presencia de resistencia frente a los BZs. Inicialmente, estos ensayos requerían el cálculo de la dosis eficaz 50 (DE₅₀), o dosis capaz de inhibir el desarrollo en el 50% de los huevos, del tiabendazol. Se estableció que una DE₅₀ con valor mayor de 0,1 µg/ml de tiabendazol era indicativo de resistencia, y con valor inferior, susceptible²⁵⁹. Años más tarde, la técnica se simplificó mediante el estudio de la actividad ovicida a una sola dosis discriminante de 0,1 µg/ml, considerándose que un porcentaje de eclosión mayor al 50% es indicativo de resistencia a los BZs^{277,278}.

En 2009, Von Samson-Himmelstjerna *et al.*²⁷⁷ estandarizaron y validaron el protocolo en diferentes laboratorios europeos con el fin de asegurar su repetibilidad. Fijaron algunos aspectos no clarificados en el protocolo propuesto inicialmente por Coles *et al.*²⁵⁹, como el tipo de agua que se debe utilizar, la preparación y disolución del tiabendazol y el tiempo que debe transcurrir desde que se recogen las heces hasta

que se realiza el ensayo. Este último factor es muy importante, ya que la sensibilidad del tiabendazol disminuye con el tiempo, recomendándose no esperar más de 3 horas. En el caso de no poder llevarlo a cabo en ese transcurso de tiempo, se aconseja que el método de almacenamiento de heces sea al vacío ^{279,280}.

Otros ensayos están enfocados en la evaluación de los efectos de los compuestos sobre la motilidad de las larvas. Entre ellos, se pueden encontrar el **ensayo de motilidad larvaria** o LMT (del inglés, *larval motility test*), basado en la determinación del porcentaje de larvas que sufren parálisis cuando se incuban con diferentes compuestos ²⁸¹. Este tipo de ensayo presenta muchas variaciones. Se puede evaluar la presencia o ausencia completa de movimiento en el parásito o, en algunos casos, los autores establecen escalas numéricas de motilidad, que incluyen distintos grados de movimiento en las larvas.

El LMT también se desarrolló inicialmente para evaluar la eficacia del levamisol y tartrato de morantel utilizando cepas de campo y por lo tanto, evaluando la posible presencia de RA, aunque no se utiliza de forma rutinaria en la actualidad ²⁸².

Estos ensayos se han utilizado para evaluar la eficacia de compuestos sobre diferentes tipos de nematodos como larvas infectantes de *Ancylostoma* spp., *Necator americanus* y *Strongyloides* spp. ²⁸³; L₁S de *T. muris* ²⁸⁴; L₃S de *H. contortus*, *T. circumcincta* y *T. colubriformis* ^{285,286}; y L₄S de *C. elegans* ²⁸⁷, entre otros.

Algunos trabajos de este tipo han permitido detectar interesantes candidatos a fármacos AHs. Preston *et al.* ²⁸⁸ encontraron un compuesto prometedor que había sido desarrollado anteriormente como plaguicida, denominado Tolfenpyrad, durante el cribado de alto rendimiento de 400 compuestos de la quimioteca "Pathogen Box". Este, inhibía la motilidad de las L₃S de *H. contortus*, por lo que se llevaron a cabo, entre otros, ensayos de motilidad para calcular su DE₅₀ y confirmar su actividad. Otro cribado de alto rendimiento de más de 14.000 compuestos de la librería "Open Scaffold", permitió detectar otro posible candidato identificado como SN00797439, mediante la inhibición de la motilidad de L₃S de *H. contortus*. Después, la actividad del compuesto se probó también en otros nematodos, como L₁S de *T. muris*, adultos de *A. ceylanicum*, adultos y microfilarias de *Brugia malayi* y microfilarias de *Dirofilaria immitis* ²⁸⁹.

Otro tipo de ensayo que utiliza L₃s es **el ensayo de inhibición de la migración larvaria** o LMIT (del inglés, *larval migration inhibition test*). Demeler *et al.*²⁹⁰ intentaron desarrollar un protocolo estandarizado comparando la actividad *in vitro* de la ivermectina en cepas con distinta susceptibilidad en diferentes especies de NGI. Para ello, las larvas se incubaron durante un periodo de 24 horas con diferentes concentraciones de ivermectina y posteriormente se evaluó su capacidad de migración a través de un tamiz con un diámetro de poro de 25 µm. De esta manera, el ensayo permitió establecer la DE₅₀ de cada cepa. Observaron que cuanto mayor fue la DE₅₀ obtenida, mayor fue la resistencia de la cepa a la ivermectina. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha informado del uso de este protocolo estandarizado para la detección de la resistencia con muestras recogidas en el campo²⁹¹.

Se han descrito algunas variaciones del ensayo que evalúan la capacidad de las L₃s de migrar fuera del bloque de agar tras la exposición al fármaco²⁹² y otras que combinan el uso de tamices y agar, lo que ha mejorado considerablemente la sensibilidad de la técnica²⁹³.

En los últimos años, el LMIT se ha utilizado para el cribado de diferentes compuestos como derivados de plantas en distintos NGI^{294–296}, y derivados de BZs²⁷² en *T. circumcincta*. Otro compuesto candidato, identificado como KSI-4088, fue seleccionado durante un cribado de 10.000 compuestos, utilizando como modelo el nematodo de vida libre *C. elegans*. Se evaluó su capacidad para producir la inhibición de la motilidad del nematodo mediante LMIT²⁹⁴.

La mayor parte de los AHs afectan de alguna manera al metabolismo del parásito y, por lo tanto, los efectos que provocan en su desarrollo ofrecen formas potenciales de cribado de compuestos. El LDT se basa en la capacidad de las larvas para sobrevivir y desarrollarse *in vitro* bajo distintas concentraciones de AH. Para ello, se examina el desarrollo de las L₁s (obtenidas a partir de los huevos de una muestra de heces) hasta L₃ bajo distintas dosis del AH²⁹⁷. Existen diversas variaciones del formato básico del ensayo, aunque se pueden dividir en dos grupos: las que realizan la incubación en medio líquido^{297–299} y las que utilizan medio sólido de agar³⁰⁰.

El principal inconveniente del LDT es que se requieren 7 días para llevarlo a cabo, en comparación con el resto de los ensayos en los que la duración de la incubación es de entre 24 y 72 horas. Aun así, el LDT permite detectar mayor cantidad de candidatos porque evalúa la acción del compuesto sobre distintas fases parasitarias a la vez, sin centrarse únicamente en una como ocurre en los otros ensayos ²⁷⁰. Además, no requiere la utilización de huevos no desarrollados o muestras frescas como en el caso del EHT.

Aparte del cribado de nuevos compuestos, permite detectar la presencia de resistencia a los BZs, imidazotiazoles, LMs ²⁹⁸ y monepantel ³⁰¹. Basado en este ensayo, se ha desarrollado un producto comercial denominado DrenchRite®, desarrollado por Commonwealth Scientific Industrial Research Organization (CSIRO) en Australia, que permite detectar la presencia de RA a los BZs, levamisol y LMs. Básicamente se trata de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contienen agar impregnado con el fármaco.

Como en casos anteriores, el LDT se ha utilizado para el cribado de compuestos derivados de plantas³⁰²⁻³⁰⁴ en los géneros de NGI más prevalentes como *T. circumcincta*, *H. contortus* y *T. colubriformis*, así como para compuestos químicos como el Tolfenpyrad ²⁸⁸ y análogos de la norcantharidin ³⁰⁵ en *H. contortus*.

Por otra parte, también se han descrito **ensayos *in vitro* frente a las formas adultas** del parásito a través de la evaluación de su motilidad tras la incubación con el compuesto o fármaco de interés. Los resultados se expresan como porcentaje de adultos móviles y no móviles, o mediante una puntuación de la reducción de motilidad, de manera muy similar al LMT ^{306,307}

La capacidad de producir parálisis de los compuestos se ha evaluado utilizando medidores de motilidad ³⁰⁸ y mediante la simple observación del grado de motilidad de los parásitos tratados con el fármaco, en comparación con los controles ³⁰⁹.

La utilización de las formas adultas de los parásitos no permite llevar a cabo un cribado de compuestos de alto rendimiento, por lo que en la mayor parte de las ocasiones, estos ensayos se utilizan después de cribados primarios previos realizados con técnicas diferentes. O'Grady & Kotze ³⁰⁶ pusieron a punto la técnica en *H.*

contortus probando un total de 200 compuestos que habían sido seleccionados previamente con el LDT. También se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar la actividad antihelmíntica de derivados de plantas en *H. contortus*, *T. colubriformis*, *T. circumcincta*, *T. muris*, *Schistosoma mansoni*, etc ^{310–313}. Otros estudios incluyen parásitos como *Ancylostoma ceylanicum*, *B. malayi*, *T. muris* y *H. polygyrus* ^{289,314–316}.

Entre muchos **otros tipos de ensayos *in vitro***, se pueden encontrar ensayos que evalúan la capacidad de los compuestos para actuar en el proceso de desvainado de las larvas infectantes ³¹⁷ y ensayos colorimétricos que evalúan la actividad metabólica celular de los parásitos. Hördegen *et al.* ³¹⁸ desarrollaron un ensayo basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en formazán, un compuesto de color azul, lo que permitía diferenciar larvas de *H. contortus* muertas (color amarillo-marrón) de vivas (color azul). También se han utilizado otros colorantes, como el azul de metileno, el rojo neutro y el azul de tripán, para evaluar la viabilidad de la fase adulta del parásito trematodo *S. mansoni* ³¹⁹. Recientemente, Jasmer *et al.* ³²⁰ utilizaron dos sondas nucleares fluorescentes, la bisbenzimidida y el yoduro de propidio, para evaluar los cambios patológicos producidos en L₃S, L₄S y adultos del nematodo *Ascaris suum* por la exposición a toxinas intestinales de nematodos mediante microscopía de fluorescencia. Aunque se utilizó a *A. suum*, los autores sugirieron que este enfoque sería aplicable a otras especies de nematodos.

Entre los inconvenientes de este tipo de ensayos basados en la observación al microscopio de las diferentes formas parasitarias tras la incubación con los compuestos, destaca la subjetividad de la interpretación de los resultados, puesto que se trata de métodos no automatizados que requieren la evaluación manual de los fenotipos de los parásitos por parte de un operador capacitado, lo que conlleva también restricciones en el rendimiento ³²¹.

5.2 Nuevos ensayos de cribado de alto rendimiento

A pesar de que las nuevas plataformas de cribado de compuestos de alto rendimiento persiguen la aceleración del proceso de descubrimiento de nuevos

fármacos, así como la minimización del trabajo y del consumo de compuestos, a menudo los costes financieros de este tipo de ensayos automatizados pueden llegar a ser considerablemente elevados ^{270,321}.

El primer sistema que dio paso al desarrollo de plataformas de cribado de alto rendimiento fue un medidor de micromotilidad, desarrollado para larvas y adultos de algunos nematodos como *A. suum* ³⁰⁸, y que posteriormente se adaptó específicamente para L₃s de *H. contortus* ^{322,323}. Este sistema emplea un sensor de luz que capta las señales del menisco de la solución que contiene los parásitos. De esta manera, el movimiento activo de los parásitos provoca un aumento de las desviaciones del haz, mientras que la ausencia de movimiento en parásitos paralizados o muertos se detecta como reducciones de las desviaciones del haz ³⁰⁸. Aunque este tipo de ensayos proporcionan mediciones relativamente objetivas que evalúan el movimiento de los parásitos de forma automatizada, el empleo de tubos Falcon en lugar de placas multipocillos hace que el rendimiento de la técnica sea bastante bajo. De ahí que pasara a utilizarse en cribados secundarios de compuestos en vez de primarios.

Por otro lado, Lockery *et al.* ³²⁴ desarrollaron una plataforma basada en microfluidos que permitía detectar la actividad eléctrica de la faringe de *C. elegans*, realizando lecturas electrofisiológicas no invasivas de su función neuromuscular. Se trata de una técnica que cada vez se utiliza más como modelo en el descubrimiento de AHs ^{325,326}. Este sistema se adaptó posteriormente para evaluar la actividad de las L₄s de *A. ceylanicum* y de las L₃s de *A. suum* frente a varios candidatos a fármacos AHs ³²⁷. Aunque las plataformas basadas en microfluidos no se adaptan a un formato de alto rendimiento, permiten realizar mediciones detalladas y en tiempo real de los efectos de los compuestos, lo que supone una gran ventaja en el estudio de compuestos con mecanismo de acción desconocidos.

Con el paso del tiempo, la integración de tecnologías ha dado paso al desarrollo de plataformas automatizadas que permiten el registro de fenotipos y el análisis de datos, poniendo en marcha plataformas de cribado de compuestos de mucho mayor rendimiento ^{325,326,328,329}.

Los ensayos basados en la fotometría permiten medir la absorbancia, fluorescencia, luminiscencia o dispersión de la luz para identificar alteraciones fenotípicas en los parásitos tras su exposición al fármaco. Las primeras técnicas basadas en la absorbancia utilizaban un espectrofotómetro estándar para obtener lecturas, pero recientemente se han introducido lectores de microplacas robustos y eficientes. Estos, proporcionan mediciones objetivas y cuantitativas en un formato de rendimiento medio (utilizando placas de 96 pocillos) o alto (utilizando placas de 384 o 1536 pocillos)³²⁶.

Asimismo, se han desarrollado ensayos colorimétricos basados en la inclusión del colorante vital MTT en el parásito, demostrando ser muy útiles en el cribado fenotípico de diversos nematodos como *C. elegans* y *H. contortus*³³⁰⁻³³³. También se han desarrollado otros ensayos similares basados en la reducción de compuestos como el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetaxi-fenil)-2-4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS)³³⁴ y la sal de tetrazolio 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), que permiten evaluar la viabilidad de *C. elegans*. Phiri *et al.*³³⁵ también establecieron una plataforma con *C. elegans* basada en la capacidad del colorante 3-amino-7-dimetil-amino-2-metil-furazide hidroclorehídrico (rojo neutro), para incorporarse a los lisosomas y liberarse tras el daño celular. La principal ventaja de todos estos ensayos es que proporcionan mediciones relativamente objetivas y cuantitativas.

De manera similar, se han puesto a punto plataformas de cribado basadas en la medición de fluorescencia que utilizan lectores de microplacas de fluorescencia y citómetros. Estos ensayos utilizan sondas fluorescentes para obtener medidas fenotípicas de la viabilidad de los parásitos. Marcadores fluorescentes como el 2,1,3-benzotiadiazol (DB-1) y el yoduro de propidio, permiten identificar parásitos vivos en la población, y otros marcadores fluorescentes como el Sytox, permiten identificar los parásitos muertos en *C. elegans*^{336,337}.

Los ensayos que se basan en las mediciones de los microhaces infrarrojos también se han utilizado para examinar la actividad antihelmíntica de diferentes compuestos. Simonetta & Golombek³³⁸ desarrollaron un sistema que permitía evaluar la locomoción de *C. elegans* a través de mediciones de la interferencia que provoca el

movimiento del parásito en un haz de luz infrarroja y registraba "recuentos de actividad" como medida de la motilidad. Esto fue la base para el desarrollo de un nuevo instrumento automatizado conocido como wMicroTracker (Phylumtech, Sunchales, Argentina). Este dispositivo detecta la dispersión de luz provocada por el movimiento de los organismos cuando estos son sometidos a microhaces de luz infrarroja. Cuando los organismos dispersan la luz de los microhaces se incrementa un contador de actividad locomotora, y el resultado puede verse como la actividad acumulada en el tiempo (actividad total o cinética) (Fig. 10).

A partir de esto, se han puesto a punto numerosos protocolos que utilizan el wMicrotracker en cribados de colecciones de compuestos con *C. elegans* y algunos NGI como *H. contortus*, *T. circumcincta*, *O. ostertagi* y *C. onchophora*³³⁹⁻³⁴¹. Diversas adaptaciones y mejoras en la utilización de este dispositivo han permitido cribados de hasta 10.000 compuestos por semana, demostrando ser una herramienta muy práctica, rentable y eficaz. Este es el caso de Taki *et al.*³⁴⁰, quienes fueron capaces de probar un total de 80.500 compuestos en L₃s de *H. contortus*. Para ello, dispusieron 320 compuestos en cada placa de 384 pocillos, utilizando 16 pocillos como controles negativos y 16 como controles positivos y los incubaron durante un total de 90 horas.



Figura 10. wMicrotracker One. Fuente: www.phylumtech.com.

Muchos de estos tipos de ensayos se centran en la evaluación de la motilidad del nematodo, pero también se pueden encontrar otros enfocados en determinar la fecundidad³⁴², el crecimiento^{342,343} y la supervivencia de los parásitos³³⁴.

La integración de la física, la ingeniería, la química y la biología facilitó la evaluación de las alteraciones fenotípicas inducidas por los compuestos mediante la obtención de mediciones cuantitativas de los cambios en la producción de calor o la impedancia³⁴⁴. Los avances más recientes han permitido desarrollar microcalorímetros isotérmicos capaces de evaluar cuantitativamente la motilidad del parásito de manera indirecta, a través de mediciones de los cambios en la producción de calor generadas durante el movimiento del parásito. Sin embargo, se han puesto a punto únicamente en los trematodos *S. mansoni*³⁴⁵ y *Fasciola hepatica*³⁴⁶.

Por otro lado, el sistema xCELLigence, es un dispositivo de monitorización celular en tiempo real basado en la impedancia eléctrica que permite medir la eclosión de los huevos y la motilidad de los parásitos en un formato automatizado de alto rendimiento. Este dispositivo consta de microelectrodos que miden los cambios producidos en la impedancia eléctrica cuando los gusanos se mueven a través de los electrodos. Se ha aplicado entre muchos otros, al nematodo *H. contortus* para medir la eclosión de los huevos y/o la motilidad³⁴⁷. Rinaldi *et al.*³⁴⁸ mejoraron el sistema xCELLigence para convertirlo en un ensayo de motilidad de parásitos en tiempo real xCELLigence (xWORM) realizando diversos ajustes de frecuencia. La principal desventaja que presenta este sistema es el alto requerimiento de tiempo de análisis. Además, no permiten analizar un nuevo lote de compuestos hasta que se haya completado el análisis anterior.

El uso de cámaras de alta resolución, junto con programas informáticos de análisis de imágenes, microscopía y otros instrumentos de adquisición de imágenes, ha dado paso al desarrollo de plataformas de cribado de alto rendimiento mejoradas³²⁶. Algunas plataformas de imágenes se desarrollaron utilizando microscopía de campo brillante acoplada a cámaras de alta resolución. Estas, permiten la grabación de imágenes y/o vídeos y su análisis a través programas informáticos especializados. Fueron desarrolladas para medir caracteres fenotípicos como la morfología corporal y/o la motilidad de *C. elegans* y *H. contortus*^{321,349}.

El WormAssay es un software informático de código abierto, creado por Marcellino *et al.*³⁵⁰ con el fin de evaluar la motilidad de los parásitos adultos de *B. malayi*. Este software se basó en un sistema de captura de imágenes y análisis de

datos, capaz de grabar placas de 24 pocillos con parásitos en su interior, utilizando una cámara colocada debajo de la placa. Años más tarde, Storey *et al.* ³⁵¹ adaptaron este ensayo y modificaron el software para desarrollar una plataforma denominada Worminator, capaz evaluar la motilidad de las L₃s de *Cooperia* spp., las microfilarias de *B. malayi* y *D. immitis*, y los adultos de *B. pahangi* ³⁵². La utilización de placas de 96 y 384 pocillos permitió lograr rendimientos medios y altos de cribado ³⁵¹.

Partridge *et al.* ³⁴³ también implementaron una "plataforma de fenotipado automatizado de invertebrados" o INVAPP (del inglés *invertebrate automated phenotyping platform*), acoplada a un algoritmo denominado "Paragon". Este sistema estaba formado por una cámara de alta resolución y un panel de diodos emisores de luz, capaces de medir la motilidad y el desarrollo de algunos nematodos como *C. elegans*, *H. contortus*, *T. circumcincta* y *T. muris*.

Mathew *et al.* ³⁵⁴ desarrollaron otro dispositivo diferente denominado "WormScan" que permitió una evaluación automatizada y cuantitativa de cuatro fenotipos diferentes de *C. elegans* cultivados en placa de Petri: muerte, fecundidad, motilidad y tamaño. Este sistema utilizaba el estímulo de luz de un escáner para inducir la motilidad del gusano. Después, las imágenes escaneadas se analizaban utilizando un software específico. Diferentes adaptaciones y mejoras del dispositivo, han permitido medir la viabilidad de *C. elegans* ³⁵⁵ e incrementar su rendimiento considerablemente, siendo capaz de evaluar cuatro placas de 96 pocillos a la vez ³⁵⁶. Puckering *et al.* ³⁵⁷ también lo adaptaron para desarrollar un "Wormscan" automatizado, con un programa informático capaz de enumerar parásitos, en comparación con el sistema basado en el aprendizaje automático utilizado en el ensayo inicial.

Las plataformas de captura de imágenes o vídeos de alto rendimiento también se han acoplado a chips de microfluidos para obtener mediciones detalladas y en tiempo real de los efectos de los compuestos en los parásitos. La mayoría de estos chips se desarrollaron para medir detalladamente la motilidad y/o el crecimiento de *C. elegans*, normalmente a pequeña escala ³⁵⁸⁻³⁶⁰.

A continuación, la Figura 11 muestra de manera gráfica todos los sistemas de cribado de compuestos de bajo, medio y alto rendimiento explicados en el apartado.

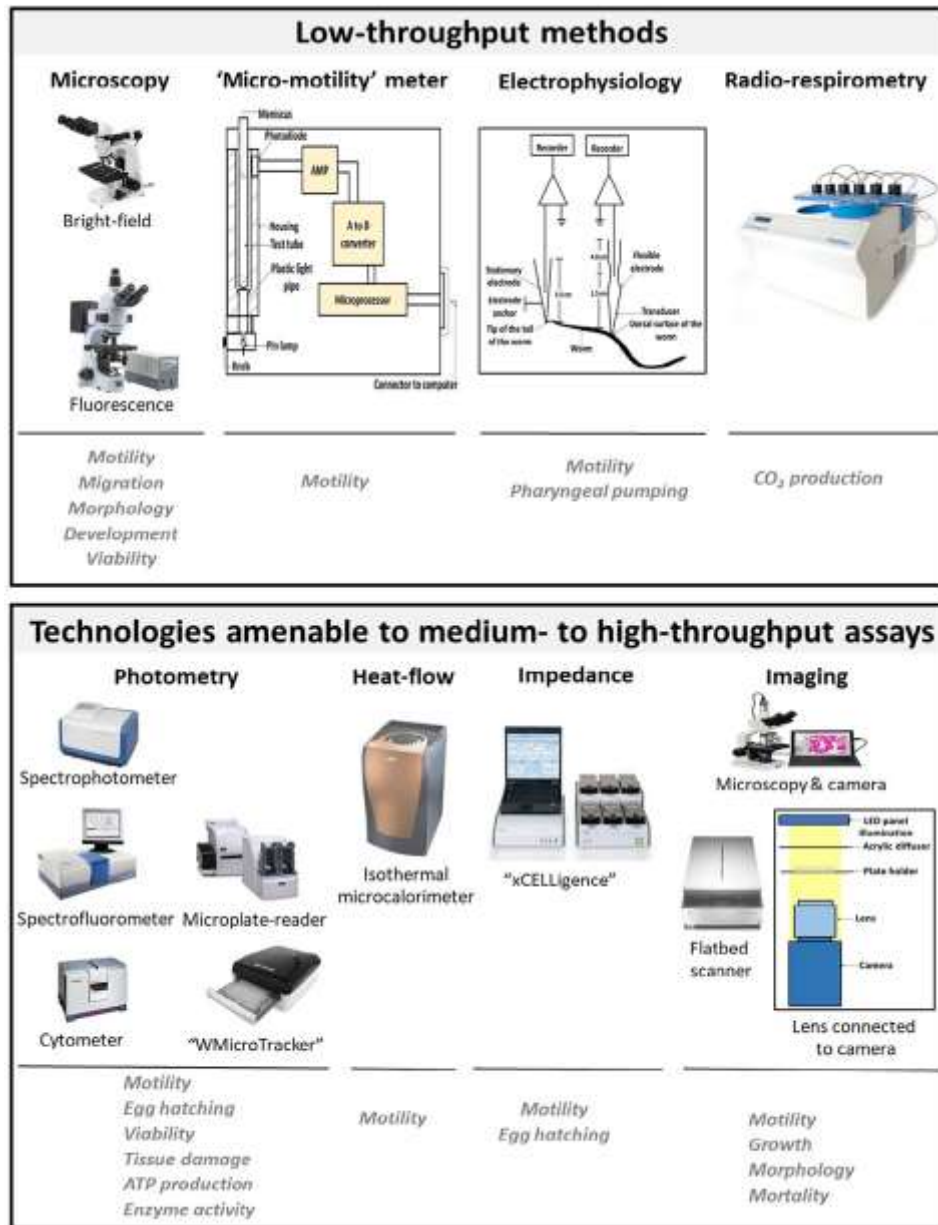


Figura 11. Resumen de las técnicas utilizadas en los ensayos de cribado fenotípico de helmintos empleados para el descubrimiento de antihelmínticos. Los ensayos de bajo rendimiento se basan en la microscopía de campo brillante o de fluorescencia, los micromedidores, la electrofisiología o los radiorespirometros. Las tecnologías capaces de realizar ensayos de medio o alto rendimiento incluyen instrumentos o sistemas de imagen basados en la fotometría, el flujo de calor o la impedancia. Los parámetros fenotípicos evaluados o medidos se indican en letra gris. Tomada de Herath *et al.* ³⁴⁴.

5.3 Últimos avances en el descubrimiento de compuestos con actividad antihelmíntica.

Se puede hablar de distintos enfoques a la hora de desarrollar nuevos AHs que permitan controlar las infecciones producidas por NGI. El primero, y más clásico, es la **síntesis de nuevas entidades químicas activas** contra los parásitos. El acceso a grandes colecciones de compuestos, la colaboración con investigadores del campo de la química y la disponibilidad de tecnología de cribado de alto rendimiento, favorecen el descubrimiento de estas entidades químicas ³⁶¹.

Si bien es cierto que este enfoque puede facilitar el descubrimiento de moléculas con mecanismo de acción novedosos, se trata de un proceso complicado, largo y costoso ³⁶². Por lo general, llevar una nueva entidad química al mercado es un proceso de una o dos décadas, que debe pasar por el descubrimiento y la optimización de candidatos (2-5 años), el desarrollo preclínico (1-2 años), el desarrollo clínico (6-7 años) y el registro y la comercialización (1-2 años). Además, supone un importante coste financiero de cientos de millones a miles de millones de euros ³⁶³.

La búsqueda de nuevas dianas farmacológicas (“targets”) y la identificación de proteínas esenciales, cuyo bloqueo provoca la muerte del parásito, pueden acelerar el proceso de desarrollo de nuevos candidatos a fármacos ³⁶⁴. Bajo este contexto, ³⁶⁵ descubrieron múltiples series de pequeñas moléculas como nuevos AHs potenciales mediante el análisis de “chokepoints”. Se trata de un concepto utilizado para encontrar enzimas que producen o consumen de forma exclusiva un metabolito concreto y que por tanto, son esenciales para la célula. De esta manera, descubrieron las palmitoiltransferasas de carnitina como posible diana farmacológica en los nematodos, identificando varias moléculas activas, entre ellas la perhexilina con actividad frente a las primeras fases larvarias de *C. elegans*, *H. contortus* y *Onchocerca lienalis* ³⁶⁶.

Otra posibilidad es el cribado de compuestos sobre las distintas fases de los parásitos mediante técnicas de alto rendimiento, lo que permite probar miles de compuestos diferentes simultáneamente. Dicha estrategia permite identificar nuevas

entidades químicas con potencial efecto AH e identificar compuestos que supongan un buen punto de partida para la optimización y el desarrollo de nuevas moléculas.

Este fue el caso del cribado de la quimioteca "Open Scaffolds", la cual contiene un total de 33.999 compuestos, sobre los que se dispone de información sobre sus propiedades fisicoquímicas³⁶⁷. En este estudio se analizaron 14.464 compuestos frente a L₃s de *H. contortus*, que dio como resultado un compuesto eficaz, el 1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida, denominado SN00797439²⁸⁹, al que siguieron estudios de optimización de química medicinal dando lugar a un conjunto de 64 análogos. El compuesto más potente de este conjunto inhibió el desarrollo de L₄s de *H. contortus* con valores de DE₅₀ de 0,01 μM^{316,368}. Además, se demostró que este compuesto actúa frente a especies de nematodos genéticamente distintas, incluyendo *T. muris*, *A. ceylanicum*, *B. malayi* y *D. immitis*, lo que indica un espectro de actividad relativamente amplio.

A partir del cribado primario de 236 compuestos de la quimioteca "Kurz-box", llevado a cabo en L₃s y L₄s de *H. contortus*, se identificaron dos candidatos, designados como BLK127 y HBK4, que indujeron cambios fenotípicos en L₃s de *H. contortus*. El compuesto BLK127 además inhibió el desarrollo de las L₄s, mostrando una DE₅₀ de 7.98 ± 0.68 μM. La quimioteca que se probó estaba constituida por familias de compuestos químicamente diversas, como compuestos heterocíclicos (por ejemplo, tiazoles, pirroles, quinolinas, pirimidinas, benzo[1,4]diazepinas) e inhibidores de metaloenzimas a base de ácidos hidroxámicos, peptidomiméticos (bis y tris-pirimidoneamidas, alcoxiámidas)³⁶⁹. La actividad de dichos compuestos contra huevos y adultos de *H. contortus* en cepas susceptibles y resistentes a BZs y LMs fue evaluada más adelante, así como su hepatotoxicidad en ratas y ovejas, y su biotransformación en adultos de *H. contortus* y en el hígado ovino²⁷⁶. Ninguno mostró efecto inhibitorio sobre la eclosión de los huevos, mientras que la benzoamida BLK127 disminuyó significativamente la viabilidad de los adultos, incluso en las cepas resistentes, sin mostrar ningún efecto hepatotóxico. Este, redujo significativamente la viabilidad de las hembras a una concentración de 1 μM, y de los machos a una concentración de 10 μM. Además, se demostró que formaba varios metabolitos en el estudio de biotransformación, aunque en bajas cantidades. Por el contrario, el compuesto HBK4

no tuvo ningún impacto en la viabilidad de los adultos de *H. contortus* y mostró una hepatotoxicidad significativa, por lo que fue excluido de futuros estudios. Por consiguiente, el BLK127 parece ser un candidato potencial para ser un nuevo fármaco AH. En la actualidad, se está estudiando el metabolismo y el mecanismo de acción de este candidato ²⁷⁶.

Debido al nivel de conservación de las secuencias en gran parte del filo de los nematodos, *C. elegans* ha demostrado ser un buen modelo sustituto de los nematodos parásitos ³²⁶. Por ejemplo, Burns *et al.* ³⁷⁰ identificaron un total de 275 candidatos que producían la muerte de *C. elegans* a partir de un cribado inicial de 67.012 compuestos. Posteriormente, se observó que 113 de los 275 compuestos candidatos presentaban una actividad ovicida mayor al 90% a una concentración de 60 μM en *C. onchophora* y *H. contortus*.

Con un enfoque similar, Mathew *et al.* ³⁵⁶ descubrieron 14 compuestos con efecto sobre el crecimiento y fecundidad de *C. elegans* a partir de un cribado de alto rendimiento a una concentración inicial de 43 μM llevado a cabo en dos quimiotecas: “Chembridge” y “Maybridge”.

Otro cribado de alto rendimiento de 480 pequeñas moléculas frente a adultos de *T. muris*, reveló una nueva clase de compuestos con actividad antihelmíntica, las dihidrobenzoxazepinonas. Los compuestos más activos inmovilizaron a los adultos de *T. muris* con valores de DE_{50} en torno a 25-50 μM , comparables a los del levamisol. El OX02983, fue capaz de reducir el establecimiento de la infección *in vivo* en un 54%, lo que señala el camino hacia un potencial tratamiento para la tricuriasis ³⁷¹.

Partridge *et al.* ³⁴³ identificaron otra serie de compuestos con actividad frente a adultos y huevos de *T. muris*, las diaminotienopirimidinas. Es importante destacar que estos compuestos, como serie química, son relativamente fáciles de producir sintéticamente, por lo que presentan un margen considerable para realizar modificaciones estructurales con el fin de mejorar la eficacia. Además han demostrado presentar actividad frente a la malaria, aunque hasta ahora no se había descrito que tuvieran actividad antihelmíntica.

Por otro lado, Preston *et al.* ³²¹ realizaron otro cribado de 522 inhibidores de quinasa en el que identificaron dos sustancias químicas, una amida de bifenilo y un análogo del pirazolo[1,5-a]piridina, que inhibían la motilidad y el desarrollo de las L₃s y L₄s de *H. contortus* mostrando unos valores de DE₅₀ en un rango entre 14 y 47 µM.

Otro enfoque cada vez más atractivo para el desarrollo de fármacos es el cribado de fármacos que ya han sido aprobados para el tratamiento de otras enfermedades. La ventaja de esta estrategia, también llamada "**reposicionamiento de fármacos**" o "**cambio terapéutico**", es la disponibilidad de datos preclínicos y clínicos de los compuestos y el bajo coste de su producción en comparación con la síntesis de nuevas entidades químicas. Además, la reutilización de fármacos aprobados para otras indicaciones minimiza el riesgo de fracaso por toxicidad y, por tanto, conduce a una aprobación más rápida de los medicamentos por parte de los organismos reguladores ^{372,373}.

En los últimos años, se han puesto en marcha diversas iniciativas de reconversión de fármacos en muchos campos de la medicina, incluida la parasitología. Estos esfuerzos han aportado algunos candidatos prometedores para la reutilización de fármacos, aunque, según los datos publicados hasta la fecha, la cuestión de si los fármacos identificados se convertirán en nuevos AHs sigue abierta (Panic *et al.*, 2014).

Por ejemplo, se identificaron 12 moléculas eficaces frente a L₃s de *A. ceylanicum* en un cribado de 1.600 compuestos de una quimioteca aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos o FDA (del inglés *Food and Drugs Administration*) de Estados Unidos ³⁷⁴. Otras pruebas llevadas a cabo frente a varias especies de helmintos revelaron que el triclorfón, un insecticida organofosforado de amplio espectro, era activo frente diferentes estadios de *A. ceylanicum*, *H. polygyrus* y *T. muris*. Más recientemente, el triclorfón se probó a una dosis de 100 mg/kg para el tratamiento de la haemoncosis, dando lugar a una importante reducción del recuento de huevos en heces (99%) en corderos infectados con una cepa multirresistente de *H. contortus* ¹³². A pesar de estos resultados, el uso de este plaguicida es cuestionable ya que se han comunicado numerosos efectos adversos derivados de su uso.

Otros ejemplos que se pueden encontrar son los cribados realizados con las quimiotecas “Pathogen Box” y “Stasis Box”, cada una de ellas formadas por 400 compuestos, en las que su actividad fue evaluada frente a L₃s y L₄s de *H. contortus*. De ellas, el tolfenpirad, un plaguicida ya aprobado, así como dos inhibidores de la quinasa, mostraron una inhibición de la motilidad de las larvas en un rango de concentración prometedor ^{288,314}. Más concretamente, los inhibidores de la quinasa, SNS-032 y AG-1295 mostraron unos valores DE₅₀ de 12,4 y 9,92 μM, respectivamente, inhibiendo la motilidad de las L₃s. Aunque ninguno tuvieron actividad inhibitoria detectable sobre la motilidad de las L₄s, ambos inhibieron su desarrollo (valores de DE₅₀ = 41,24 μM y 7,75 μM para SNS-032 y AG-1295, respectivamente). Le *et al.* ³⁷⁶ realizaron posteriormente un estudio exhaustivo de la relación estructura-actividad del tolfenpirad para la inhibición de las L₃s de *H. contortus*, el cual dio lugar a la síntesis de una serie de análogos que alcanzaron valores de DE₅₀ en L₄s de 0,03 μM.

Otro enfoque en la búsqueda de nuevos compuestos es **la modificación de la estructura química de fármacos AHs ya conocidos**. La comprensión del mecanismo de acción del fármaco y, sobre todo, el conocimiento de su bioactividad basado en su estructura, facilitan en gran medida la generación de nuevos fármacos.

Las avermectinas son derivados de productos naturales obtenidos por fermentación de *S. avermitilis*. Los últimos avances han producido una cepa modificada genéticamente, denominada *S. avermitilis* MHJ1011, que ha dado lugar a un nuevo compuesto, la tenvermectina ³⁷⁷, con mayor actividad y menor toxicidad que la ivermectina. Los resultados mostraron que la inyección subcutánea de una única dosis de 0,3 mg/kg de tenvermectina en cerdos producía una reducción del número de huevos en heces del 99% después de 4 semanas de su administración, tanto en *A. suum* como en *Trichuris suis* ³⁷⁸.

Una de las principales clases de AHs utilizados actualmente son los BZs. Estos compuestos actúan como larvicidas y ovidas, aunque su eficacia está limitada por su escasa solubilidad en el agua. Por ello, se diseñó una sal de mebendazol no descrita anteriormente con un anión nitrato para mejorar su solubilidad en el agua ³⁷⁹. También se han llevado a cabo estudios con el albendazol, cuya solubilidad se mejoró en forma

de complejo con itaconil- β -ciclodextrina, demostrando una actividad antihelmíntica *in vitro* aumentada en comparación con el albendazol puro ³⁸⁰.

Entre los derivados del imidazol, se ha producido otro candidato prometedor, el diisopropilfenil-imidazol, el cual fue letal en larvas y adultos de *C. elegans*, ejerciendo su acción en los receptores nicotínicos. Curiosamente, este compuesto también mostró un nuevo modo de acción bioquímico ³⁶⁸.

Aunque este enfoque puede dar lugar a nuevos fármacos con mejor solubilidad y farmacocinética y, por tanto, más eficaces, hay que tener en cuenta que la resistencia frente a los AHs actualmente utilizados puede que ya esté presente y que probablemente se desarrolle, incluso de manera más rápida ²⁰.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adesogan, A. T., Havelaar, A. H., McKune, S. L., Eilittä, M. & Dahl, G. E. Animal source foods: Sustainability problem or malnutrition and sustainability solution? Perspective matters. *Glob. Food Sec.* **25**, 100325 (2020).
2. Bai, J., Seale, J. L. & Wahl, T. I. Meat demand in China: to include or not to include meat away from home? *Aust. J. Agric. Resour. Econ.* **64**, 150–170 (2020).
3. Naylor, R. Expanding the boundaries of agricultural development. *Food Secur.* **3**, 233–251 (2011).
4. Morgan, E. R. *et al.* Global change and helminth infections in grazing ruminants in europe: Impacts, trends and sustainable solutions. *Agric.* **3**, 484–502 (2013).
5. Eurostat, 2021. Database. Sheep population - annual data. https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/apro_mt_1ssheep/default/table?lang=en
6. Sistema Integral de Trazabilidad (SITRAN), 2021. *Informe SITRAN*, enero 2021
7. MAPA, 2021. El sector ovino y caprino de carne en cifras. Principales Indicadores Económicos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
8. MAPA, 2020. Encuestas de efectivos de ganado ovino y caprino. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
9. MAPA, 2021. Caracterización del sector ovino y caprino de carne en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
10. MAPA, 2021. Caracterización del sector ovino-caprino de leche en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
11. Escribano Sánchez, M., Rodríguez de Ledesma Vega, A., Pulido García, F., Martín Bellido, M. & Mesías Díaz, F. J. Sistemas extensivos de producción animal. *Dialnet.* **50**, 465–489 (2001).
12. Castel, J. M. *et al.* Characterization of semi-extensive goat production systems in southern Spain. *Small Rumin. Res.* **47**, 133–143 (2003).
13. Marín-Bernal, A. M. & Navarro-Ríos, M. J. Analysis and diagnosis of sheep production systems in southeast spanish. *Arch. Zootec.* **63**, 519–529 (2014).
14. Pulina, G. *et al.* Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *J. Dairy Sci.* **101**, 6715–6729 (2018).
15. Paineira Iglesias, A. M. Prevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por endoparásitos en rumiantes domésticos y silvestres de la provincia de Lugo - Dialnet. (Universidad de Santiago de Compostela, 2012).
16. Eysker, M. & Ploeger, H. W. Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology.* **120**, 109-19 (2000).
17. Mavrot, F., Hertzberg, H. & Torgerson, P. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors.* **8**, 557 (2015).
18. Jacobson, C., Larsen, J. W., Besier, R. B., Lloyd, J. B. & Kahn, L. P. Diarrhoea associated with gastrointestinal parasites in grazing sheep. *Vet. Parasitol.* **282**, 109139 (2020).
19. Sutherland, I. & Scott, I. Epidemiology of gastrointestinal nematodes in grazing ruminants in

- Gastrointestinal Nematodes of Sheep and Cattle: Biology and Control*. (1st Edition) 61-83 (Wiley-Blackwell, 2009).
20. Tariq, K. A. A Review of the epidemiology and control of gastrointestinal nematode infections of small ruminants. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* **85**, 693–703 (2014).
 21. Valcárcel Sancho, F. *Atlas de parasitología ovina*. (Servet, 2009).
 22. Urguhart, G. M., Duncan, J. L., Dunn, A. M. & Jennings, F. *Veterinary parasitology*. (2nd ed) 224–234 (Blackwell Science, 1996).
 23. Bulbul, K. *et al.* A brief understanding of *Trichuris ovis* in ruminants. *IJVSAH*. **5**, 72-74 (2020).
 24. Cordero del Campillo, M. & Rojo Vázquez, F. A. Parasitosis de rumiantes. in *Parasitología veterinaria* 195–259 (Interamericana McGraw-Hill, 2000).
 25. Soulsby, E. J. L. *Helminths, arthropods, and protozoa of domesticated animals* 329-0 (Lea & Febiger, 1982).
 26. Donald, A. D., Southcott, W. H. & Dineen, J. K. *The epidemiology and control of gastro-intestinal parasites of sheep in Australia*. (Division of Animal Health, CSIRO., 1978).
 27. Morgan, E. R. & Van Dijk, J. Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Vet. Parasitol.* **189**, 8–14 (2012).
 28. Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D. & Van Wyk, J. A. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Adv. Parasitol.* **93**, 95–143 (2016).
 29. O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W. & Kahn, L. P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet. Parasitol.* **142**, 1–15 (2006).
 30. Gyeltshen, T., Kahn, L. P. & Laurenson, Y. C. S. M. Ecology of the free-living stages of Trichostrongylid parasites of sheep. *Vet. Parasitol.* **303**, 109683 (2022).
 31. Zajac, A. M. & Garza, J. Biology, epidemiology, and control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* **36**, 73–87 (2020).
 32. Waller, P. J. & Donald, A. D. The response to desiccation of eggs of *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Parasitology*. **61**, 195–204 (1970).
 33. Martínez-Valladares, M. *et al.* Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: Relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasites & Vectors*. **6**, 1–9 (2013).
 34. Vlassoff, A., Leathwick, D. M. & Heath, A. C. G. The epidemiology of nematode infections of sheep. *N. Z. Vet. J.* **49**, 213–221 (2001).
 35. Langrová, I. *et al.* Arrested development of sheep strongyles: Onset and resumption under field conditions of Central Europe. *Parasitol. Res.* **103**, 387–392 (2008).
 36. Lützelshwab, C. M. *et al.* Arrested development of *Ostertagia ostertagi*: Effect of the exposure of infective larvae to natural spring conditions of the Humid Pampa (Argentina). *Vet. Parasitol.* **127**, 253–262 (2005).
 37. Gatongi, P. M. *et al.* Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. *Vet. Parasitol.* **77**, 49–61 (1998).
 38. Smith, W. D. Some observations on immunologically mediated inhibited *Teladorsagia circumcincta* and their subsequent resumption of development in sheep. *Vet. Parasitol.* **147**, 103–109 (2007).
 39. Capitini, L. A., McClure, K. E. & Herd, R. P. Effect of environmental stimuli on pre-infective and infective stages of *Haemonchus contortus* in the Northern United States for the induction of hypobiosis. *Vet. Parasitol.* **35**, 281–293 (1990).
 40. Höglund, J., Carlsson, A. & Gustafsson, K. Effects of lambing season on nematode faecal egg

- output in ewes. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **26**, 100633 (2021).
41. Nganga, C. J., Kanyari, P. W. N., Maingi, N. & Munyua, W. K. The effect of weather on the occurrence and magnitude of periparturient rise in trichostronglyid nematode egg output in Dorper ewes in a semi-arid area of Kajiado District of Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.* **38**, 389–395 (2006).
 42. Falzon, L. C. *et al.* A longitudinal study on the effect of lambing season on the periparturient egg rise in Ontario sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* **110**, 467–480 (2013).
 43. Rinaldi, L. *et al.* *Haemonchus contortus*: spatial risk distribution for infection in sheep in Europe. *Geospat. Health.* **9**, 325–331 (2015).
 44. Van Dijk, J. & Morgan, E. R. The influence of temperature on the development, hatching and survival of *Nematodirus battus* larvae. *Parasitology.* **135**, 269–283 (2008).
 45. Van Dijk, J. & Morgan, E. R. Variation in the hatching behaviour of *Nematodirus battus*: Polymorphic bet hedging?. *Int. J. Parasitol.* **40**, 675–681 (2010).
 46. Melville, L. A., Van Dijk, J., Mitchell, S., Innocent, G. & Bartley, D. J. Variation in hatching responses of *Nematodirus battus* eggs to temperature experiences. *Parasites & vectors.* **13**, 494 (2020).
 47. Bentounsi, B., Attir, B., Meradi, S. & Cabaret, J. Repeated treatment faecal egg counts to identify gastrointestinal nematode resistance in a context of low-level infection of sheep on farms in eastern Algeria. *Vet. Parasitol.* **144**, 104–110 (2007).
 48. Van Dijk, J. & Morgan, E. R. Hatching behaviour of *Nematodirus filicollis* in a flock co-infected with *Nematodirus battus*. *Parasitology.* **136**, 805–811 (2009).
 49. Singleton, D. R., Stear, M. J. & Matthews, L. A mechanistic model of developing immunity to *Teladorsagia circumcincta* infection in lambs. *Parasitology.* **138**, 322–332 (2011).
 50. Lello, J., Boag, B., Fenton, A., Stevenson, I. R. & Hudson, P. J. Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. *Nat.* **428**, 840–844 (2004).
 51. Alizon, S. & Van Baalen, M. Multiple infections, immune dynamics, and the evolution of virulence. *Am. Nat.* **172**, 150–168 (2008).
 52. Booth, M. Climate change and the neglected tropical diseases. *Adv. Parasitol.* **100**, 39–126 (2018).
 53. Rose, H. *et al.* Climate-driven changes to the spatio-temporal distribution of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*, in sheep in Europe. *Glob. Chang. Biol.* **22**, 1271–1285 (2016).
 54. Emery, D. L., Hunt, P. W. & Le Jambre, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here?. *Int. J. Parasitol.* **46**, 755–769 (2016).
 55. Rose, H., Wang, T., Van Dijk, J. & Morgan, E. R. GLOWORM-FL: A simulation model of the effects of climate and climate change on the free-living stages of gastro-intestinal nematode parasites of ruminants. *Ecol. Modell.* **297**, 232–245 (2015).
 56. Forbes, A. B., Huckle, C. A. & Gibb, M. J. Evaluation of the effect of eprinomectin in young dairy heifers sub-clinically infected with gastrointestinal nematodes on grazing behaviour and diet selection. *Vet. Parasitol.* **150**, 321–332 (2007).
 57. Worsley-Tonks, K. E. L. & Ezenwa, V. O. Anthelmintic treatment affects behavioural time allocation in a free-ranging ungulate. *Anim. Behav.* **108**, 47–54 (2015).
 58. Högberg, N. *et al.* Effects of nematode parasitism on activity patterns in first-season grazing cattle. *Vet. Parasitol.* **276**, 100011 (2019).
 59. Hutchings, M. R., Gordon, I. J., Robertson, E., Kyriazakis, I. & Jackson, F. Effects of parasitic status and level of feeding motivation on the diet selected by sheep grazing grass/clover swards. *J. Agric. Sci.* **135**, 65–75 (2000).
 60. Ikurior, S. J. *et al.* Gastrointestinal nematode infection affects overall activity in young sheep monitored with tri-axial accelerometers. *Vet. Parasitol.* **283**, 109188 (2020).

61. Hoste, H. *et al.* Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Adv. Parasitol.* **93**, 239–351 (2016).
62. Méndez-Ortíz, F. A. *et al.* Impact of gastrointestinal parasitism on dry matter intake and live weight gain of lambs: A meta-analysis to estimate the metabolic cost of gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* **265**, 1–6 (2019).
63. Roeber, F., Jex, A. R. & Gasser, R. B. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasit. Vectors.* **6**, 153 (2013).
64. Nieuwhof, G. J. & Bishop, S. C. Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Anim. Sci.* **81**, 23–29 (2005).
65. Charlier, J. *et al.* Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Prev. Vet. Med.* **182**, 105103 (2020).
66. Fox, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet. Parasitol.* **72**, 285–308 (1997).
67. Craig, T. M. Gastrointestinal nematodes, diagnosis and control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **34**, 185–199 (2018).
68. Stear, M. J., Bishop, S. C., Henderson, N. G. & Scott, I. A key mechanism of pathogenesis in sheep infected with the nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Anim. Heal. Res. Rev.* **4**, 45–52 (2003).
69. Sykes, A. R. & Coop, R. L. Interaction between nutrition and gastrointestinal parasitism in sheep. *N. Z. Vet. J.* **49**, 222–226 (2001).
70. Selemon, M. Review on control of *Haemonchus contortus* in sheep and goat. *J. Vet. Med. Res.* **5**, 1139 (2018).
71. Angulo-Cubillán, F. J.; *et al.* *Haemonchus contortus*-sheep relationship: a review. Relación *Haemonchus contortus*-Ovino: Una Revisión. *Rev. Científica de Veterinaria.* **17**, 577–587 (2007).
72. Kaplan, R. M. & Vidyashankar, A. N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* **186**, 70–78 (2012).
73. Taylor, M. Use of anthelmintics in sheep. *In Pract.* **21**, (1999).
74. Gilleard, J. S. *et al.* A journey through 50 years of research relevant to the control of gastrointestinal nematodes in ruminant livestock and thoughts on future directions. *Int. J. Parasitol.* **51**, 1133–1151 (2021).
75. Brown, H. D. *et al.* Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1764–1765 (1961).
76. Horton, R. J. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitol. Today.* **6**, 106 (1990).
77. Márquez Lara, D. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Rev. Corpoica.* **4**, 55–72 (2003).
78. Prichard, R. K. & Ranjan, S. Anthelmintics. *Vet. Parasitol.* **46**, 113–120 (1993).
79. Lanusse, C. E. & Prichard, R. K. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* **49**, 123–158 (1993).
80. Nielsen, L. S., Burdgaard, H. & Falch, E. Prodrugs of thiabendazole with increased water-solubility. *Acta Pharm. Nord.* **4**, 43–49 (1992).
81. Prichard, R. K. Interaction of host physiology and efficacy of antiparasitic drugs. *Vet. Parasitol.* **18**, 103–110 (1985).
82. Lanusse, C. E. & Prichard, R. K. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metab. Rev.* **25**, 235–279 (1993).
83. Gottschall, D. W., Theodorides, V. J. & Wang, R. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol. Today.* **6**, 115–124 (1990).

84. Campbell, W. C. Benzimidazoles: Veterinary uses. *Parasitol. Today.* **6**, 130–133 (1990).
85. Prichard, R. K. Mode of action of the anthelmintic thiabendazole in *Haemonchus contortus*. *Nat.* **228**, 684–685 (1970).
86. Tejada, P., Sanchez-Moreno, M., Monteoliva, M. & Gomez-Banqueri, H. Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole anthelmintics. *Vet. Parasitol.* **24**, 269–274 (1987).
87. Melanie, A., Richard, M. J. & Alan, R. P. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Vet.* **67**, 137–152 (2017).
88. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492 (2010).
89. Dib Brusales, A. R. Evaluación biofarmacéutica y eficacia clínica de nuevas formulaciones de liberación modificada en base a ricobendazole en caninos. (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 2017).
90. Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schönberg, G. & Jacob, T. A. Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science.* **221**, 823–828 (1983).
91. Geary, T. & Moreno, Y. Macrocyclic lactone anthelmintics: Spectrum of activity and mechanism of action. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 866–872 (2012).
92. Lespine, A. Lipid-like properties and pharmacology of the anthelmintic macrocyclic lactones. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **9**, 1581–1595 (2013).
93. Rodríguez-Vivas, R. I. *et al.* Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *rhhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Arch. Med. Vet.* **42**, 115–123 (2010).
94. Prichard, R., Ménez, C. & Lespine, A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2**, 134–153 (2012).
95. Lespine, A. *et al.* Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure–affinity relationship. *Eur. J. Pharm. Sci.* **30**, 84–94 (2007).
96. Lloberas, M. *et al.* 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. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **3**, 20–27 (2013).
97. Kass, I. S., Stretton, A. O. W. & Wang, C. C. The effects of avermectin and drugs related to acetylcholine and 4-aminobutyric acid on neurotransmission in *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **13**, 213–225 (1984).
98. Turner, M. J. & Schaeffer, J. M. Mode of Action of Ivermectin. *Ivermectin and Abamectin* (Ed. Campbell, W.C.) 73–88 (Springers, 1989)
99. Feng, X. P., Hayashi, J., Beech, R. N. & Prichard, R. K. Study of the nematode putative GABA type-A receptor subunits: evidence for modulation by ivermectin. *J. Neurochem.* **83**, 870–878 (2002).
100. Arena, J. P., Liu, K. K., Paress, P. S., Schaeffer, J. M. & Cully, D. F. Expression of a glutamate-activated chloride current in *Xenopus* oocytes injected with *Caenorhabditis elegans* RNA: evidence for modulation by avermectin. *Mol. Brain Res.* **15**, 339–348 (1992).
101. Arena, J. P. *et al.* The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J. Parasitol.* **81**, 286–294 (1995).
102. Cully, D. F. *et al.* Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nat.* **371**, 707–711 (1994).
103. Forrester, S. G. & Siddiqui, S. Z. A novel member of the ligand-gated chloride channel gene family from *Haemonchus contortus*. *Parasitology.* **135**, 539–545 (2008).
104. Ōmura, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**, 91–98 (2008).
105. Beech, R. N. *et al.* Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility?. *Parasitology.* **138**, 160 (2011).

106. Ringstad, N., Abe, N. & Horvitz, H. R. Ligand-gated chloride channels are receptors for biogenic amines in *C. Elegans*. *Science*. **325**, 96–100 (2009).
107. Rao, V. T. S., Siddiqui, S. Z., Prichard, R. K. & Forrester, S. G. A dopamine-gated ion channel (HcGGR3*) from *Haemonchus contortus* is expressed in the cervical papillae and is associated with macrocyclic lactone resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **166**, 54–61 (2009).
108. Thienpont, D. *et al.* Tetramisole (R 8299), a new, potent broad spectrum anthelmintic. *Nat.* **209**, 1084–1086 (1966).
109. McKellar, Q. A. & Jackson, F. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol.* **20**, 456–461 (2004).
110. Enejoh, O. S. & Suleiman, M. M. Anthelmintics and their Application in Veterinary Medicine. *Med. Eng. Sci.* **2**, 117–126 (2017).
111. Harrow, I. D. & Gration, K. A. F. Mode of action of the anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole on muscle cell membrane of the nematode *Ascaris suum*. *Pestic. Sci.* **16**, 662–672 (1985).
112. Robertson, S. J. & Martin, R. J. Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 170–178 (1993).
113. Martin, R. J., Robertson, A. P. & Bjorn, H. Target sites of anthelmintics. *Parasitology.* **114**, 111–124 (1997).
114. Martin, R. J. & Robertson, A. P. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology.* **134**, 1093–1104 (2007).
115. Kaminsky, R. *et al.* A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nat.* **452**, 176–180 (2008).
116. Kaminsky, R. *et al.* Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol. Res.* **103**, 931–939 (2008).
117. Kaminsky, R. & Rufener, L. Monepantel: From Discovery to Mode of Action in *Parasit. Helminths Targets, Screens, Drugs Vaccines*. 283–296 (Wiley-VCH, 2012)
118. Lecová, L., Stuchlíková, L., Prchal, L. & Skálová, L. Monepantel: The most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology.* **141**, 1686–1698 (2014).
119. Hosking, B. C., Kaminsky, R., Sager, H., Rolfe, P. F. & Seewald, W. A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol. Res.* **106**, 529 (2010).
120. Kaminsky, R. *et al.* Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitol. Res.* **109**, 19–23 (2011).
121. Kaminsky, R. *et al.* Worms-A “license to kill”. *Vet. Parasitol.* **195**, 286–291 (2013).
122. Rufener, L., Mäser, P., Roditi, I. & Kaminsky, R. *Haemonchus contortus* Acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to Monepantel. *PLOS Pathog.* **5**, e1000380 (2009).
123. Rufener, L., Keiser, J., Kaminsky, R., Mäser, P. & Nilsson, D. Phylogenomics of ligand-gated ionchannels predicts monepantel effect. *PLOS Pathog.* **6**, e1001091 (2010).
124. Abongwa, M. *et al.* Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **8**, 36–42 (2018).
125. Little, P. R., Hodge, A., Maeder, S. J., Watson, T. G. & Seed, J. A. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* **58**, 121–129 (2010).
126. Woods, D. J. *et al.* Discovery, mode of action, and commercialization of Derquantel in *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines* 297–307 (Wiley-VCH, 2012).

127. Qian, H. *et al.* Pharmacology of N-, L-, and B-subtypes of nematode nAChR resolved at the single-channel level in *Ascaris suum*. *FASEB J.* **20**, 2606–2608 (2006).
128. Little, P. R. *et al.* Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Vet. Parasitol.* **181**, 180–193 (2011).
129. Austin, W. C. *et al.* Pyrantel tartrate, a new anthelmintic effective against infections of domestic animals. *Nat.* **212**, 1273–1274 (1966).
130. Nematocidal Drugs, Animals. Encyclopedic Reference of Parasitology 363–429 (2001) doi:10.1007/3-540-29835-5_2340.
131. Rahman, M. M. *et al.* Nitroxynil uncouples oxidative phosphorylation in the cell mitochondria and a drug wherever injectables are preferred over drenches. *Bangladesh J. Vet. Med.* **15**, 45–49 (2017).
132. Robson Duarte, E. *et al.* Anthelmintic efficacy of trichlorfon and blood parameters of young lambs infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **272**, 40–43 (2019).
133. Yonar, M. E., Yonar, S. M., Pala, A., Silici, S. & Sağlam, N. Trichlorfon-induced haematological and biochemical changes in *Cyprinus carpio*: Ameliorative effect of propolis. *Dis. Aquat. Organ.* **114**, 209–216 (2015).
134. Abbott, K., Taylor, M. & Stubbings, L. Sustainable Worm Control Strategies for Sheep in *A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisors* 1–78 (SCOPS, 2012).
135. Nipane, S. F., Mishra, B. & Panchbuddhe, A. N. Anthelmintic resistance-clinician's present concern. *Vet. World.* **1**, 281–284 (2008).
136. Fissiha, W. & Kinde, M. Z. Anthelmintic resistance and its mechanism: A review. *Infect. Drug Resist.* **14**, 5403–5410 (2021).
137. Kaplan, R. M. Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **36**, 17–30 (2020).
138. Jabbar, A. *et al.* Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci.* **79**, 2413–2431 (2006).
139. Morgan, E. R. & Coles, G. C. Nematode control practices on sheep farms following an information campaign aiming to delay anthelmintic resistance. *Vet. Rec.* **166**, 301–303 (2010).
140. Cabaret, J., Benoit, M., Laignel, G. & Nicourt, C. Current management of farms and internal parasites by conventional and organic meat sheep French farmers and acceptance of targeted selective treatments. *Vet. Parasitol.* **164**, 21–29 (2009).
141. Sangster, N. C. Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int. J. Parasitol.* **29**, 115–124 (1999).
142. Falzon, L. C. *et al.* A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Prev. Vet. Med.* **117**, 388–402 (2014).
143. Papadopoulos, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rumin. Res.* **76**, 99–103 (2008).
144. Saeed, M. *et al.* Multiple anthelmintic resistance and the possible contributory factors in Beetal goats in an irrigated area (Pakistan). *Res. Vet. Sci.* **88**, 267–272 (2010).
145. Silvestre, A. & Humbert, J. F. Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *Int. J. Parasitol.* **32**, 921–928 (2002).
146. Shalaby, H. A. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it?. *Iran. J. Parasitol.* **8**, 18 (2013).
147. Sutherland, I. A., Brown, A. E. & Leathwick, D. M. Selection for drug-resistant nematodes during and following extended exposure to anthelmintic. *Parasitology.* **121**, 217–226 (2000).
148. Von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W. J., McCarthy, J. S. & Skuce, P. J. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology.*

- 134**, 1077–1086 (2007).
149. Viana Furtado, L. F., Passos de Paiva Bello, A. C. & Leite Rabelo, É. M. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. *Acta Trop.* **162**, 95–102 (2016).
 150. Kotze, A. C., Gilleard, J. S., Doyle, S. R. & Prichard, R. K. Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **14**, 264–273 (2020).
 151. Robinson, M. W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L. & Fairweather, I. A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J. Mol. Graph. Model.* **23**, 275–284 (2004).
 152. Kwa, M. S. G., Veenstra, J. G. & Roos, M. H. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **63**, 299–303 (1994).
 153. Ghisi, M., Kaminsky, R. & Mäser, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* **144**, 313–320 (2007).
 154. Mohammedsalih, K. M. *et al.* New codon 198 β -tubulin polymorphisms in highly benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* from goats in three different states in Sudan. *Parasites and Vectors* **13**, 1–15 (2020).
 155. Martínez-Valladares, M. *et al.* Teladorsagia circumcincta beta tubulin: The presence of the E198L polymorphism on its own is associated with benzimidazole resistance. *Parasites & Vectors* **13**, 1–12 (2020).
 156. Saunders, G. I. *et al.* Characterization and comparative analysis of the complete *Haemonchus contortus* β -tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongyloid nematodes. *Int. J. Parasitol.* **43**, 465–475 (2013).
 157. Whittaker, J. H., Carlson, S. A., Jones, D. E. & Brewer, M. T. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **40**, 105–115 (2017).
 158. Alderborn, A., Kristofferson, A. & Hammerling, U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res.* **10**, 1249–1258 (2000).
 159. Samson-Himmelstjerna, G. Von. Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* **136**, 99–107 (2006).
 160. Barrère, V., Keller, K., Von Samson-Himmelstjerna, G. & Prichard, R. K. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. *Parasitol. Int.* **62**, 464–470 (2013).
 161. Márquez Lara, D. Mecanismos de resistencia in *Resistencia a Los Antihelminticos en Nematodos de Rumiantes Y Estrategias* 78–85 (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica y Colciencias, 2007).
 162. Blackhall, W. J., Pouliot, J. F., Prichard, R. K. & Beech, R. N. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Exp. Parasitol.* **90**, 42–48 (1998).
 163. Njue, A. I., Hayashi, J., Kinne, L., Feng, X. P. & Prichard, R. K. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel alpha3 and beta subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *J. Neurochem.* **89**, 1137–1147 (2004).
 164. McCavera, S., Rogers, A. T., Yates, D. M., Woods, D. J. & Wolstenholme, A. J. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-gated chloride channel from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Pharmacol.* **75**, 1347 (2009).
 165. Dent, J. A., Smith, M. M., Vassilatis, D. K. & Avery, L. The genetics of ivermectin resistance in

- Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2674–2679 (2000).
166. Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C. & Prichard, R. K. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist.* **2**, 58–75 (2011).
 167. Blackhall, W. J., Liu, H. Y., Xu, M., Prichard, R. K. & Beech, R. N. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**, 193–201 (1998).
 168. Xu, M. *et al.* Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 327–335 (1998).
 169. Bartley, D. J. *et al.* P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology.* **136**, 1081–1088 (2009).
 170. Heckler, R. P. *et al.* P-gp modulating drugs greatly potentiate the in vitro effect of ivermectin against resistant larvae of *Haemonchus placei*. *Vet. Parasitol.* **205**, 638–645 (2014).
 171. Raza, A., Kopp, S. R., Jabbar, A. & Kotze, A. C. Effects of third generation P-glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and -susceptible isolates of *Haemonchus contortus* to anthelmintics in vitro. *Vet. Parasitol.* **211**, 80–88 (2015).
 172. Lifschitz, A. *et al.* Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Vet. Parasitol.* **172**, 291–298 (2010).
 173. Gill, J. H. & Lacey, E. Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *Int. J. Parasitol.* **28**, 863–877 (1998).
 174. Blackhall, W. J., Prichard, R. K. & Beech, R. N. Selection at a gamma-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **131**, 137–145 (2003).
 175. Williamson, S. M. *et al.* Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **180**, 99–105 (2011).
 176. Arsenopoulos, K. V., Fthenakis, G. C., Katsarou, E. I. & Papadopoulos, E. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Anim.* **11**, 363 (2021).
 177. Ahuir-Baraja, A. E., Cibot, F., Llobat, L. & Garijo, M. M. Anthelmintic resistance: is a solution possible?. *Exp. Parasitol.* **230**, 108169 (2021).
 178. Kenyon, F. *et al.* The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet. Parasitol.* **164**, 3–11 (2009).
 179. Vineer, H. R. *et al.* Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: Creation and meta-analysis of an open database. *Parasite* **27**, 69 (2020).
 180. Bartley, D. J., Hamer, K., Andrews, L., Sargison, N. D. & Morrison, A. A. Multigeneric resistance to monepantel on a UK sheep farm. *Vet. Parasitol.* 276S, 100003 (2019).
 181. Sargison, N. D. *et al.* Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Vet. Parasitol.* **145**, 65–76 (2007).
 182. Taylor, M. A., Learmount, J., Lunn, E., Morgan, C. & Craig, B. H. Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. *Small Rumin. Res.* **86**, 67–70 (2009).
 183. Kelleher, A. C., Good, B., De Waal, T. & Keane, O. M. Anthelmintic resistance among gastrointestinal nematodes of cattle on dairy calf to beef farms in Ireland. *Ir. Vet. J.* **73**, 1–8 (2020).
 184. Vernerova, E., Vondrova, R., Kisova, H., Svobodova, V. & Hera, A. Detection of benzimidazole

- resistance in gastrointestinal nematode parasites of sheep in the Czech Republic. *Vet. Med.* **54**, 467–472 (2009).
185. Dolinská, M., Ivanišínová, O., Königová, A. & Várady, M. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by in-vitro methods. *BMC Vet. Res.* **10**, 233 (2014).
 186. Rose, H. *et al.* Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: A systematic review. *Vet. Rec.* **176**, 546 (2015).
 187. Traversa, D. & von Samson-Himmelstjerna, G. Anthelmintic resistance in sheep gastro-intestinal strongyles in Europe. *Small Rumin. Res.* **135**, 75–80 (2016).
 188. Bartley, D. J., Devin, L., Nath, M. & Morrison, A. A. Selection and characterisation of monepantel resistance in *Teladorsagia circumcincta* isolates. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **5**, 69–76 (2015).
 189. Niciura, S. C. M. *et al.* In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. *J. Helminthol.* **94**, (2020).
 190. Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C. & Vellema, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet. Parasitol.* **209**, 278–280 (2015).
 191. Claerebout, E. *et al.* Anthelmintic resistance and common worm control practices in sheep farms in Flanders, Belgium. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **20**, (2020).
 192. Álvarez-Sánchez, M. A., Pérez-García, J., Cruz-Rojo, M. A. & Rojo-Vázquez, F. A. Anthelmintic resistance in trichostrongylid nematodes of sheep farms in Northwest Spain. *Parasitol. Res.* **99**, 78–83 (2006).
 193. Martínez-Valladares, M. *et al.* The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. *Vet. Parasitol.* **191**, 177–181 (2013).
 194. Esteban-Ballesteros, M. *et al.* Quantification of resistant alleles in the β -tubulin gene of field strains of gastrointestinal nematodes and their relation with the faecal egg count reduction test. *BMC Vet. Res.* **13**, (2017).
 195. Díez-Baños, P. *et al.* Field Evaluation for Anthelmintic-Resistant Ovine Gastrointestinal Nematodes by *In Vitro* and *In Vivo* Assays. *J. Parasitol.* **94**, 925–928 (2008).
 196. Calvete, C. *et al.* Management and environmental factors related to benzimidazole resistance in sheep nematodes in Northeast Spain. *Vet. Parasitol.* **184**, 193–203 (2012).
 197. Stewart, W. C., Howell, S., Kaplan, R. M. & Murphy, T. Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes and Associated Management Factors in Intermountain West Sheep Flocks 1-4 Antiparasitic novel compounds View project. *Sheep Goat Res. J.* **35**, 30–37 (2020).
 198. Whitley, N., Schoenian, S., O'Brien, D. & Howell, S. PSVI-40 Anthelmintic Resistance Testing on Sheep Farms. *J. Anim. Sci.* **96**, 467 (2018).
 199. Queiroz, C. *et al.* The use of ITS-2 rDNA nemabiome metabarcoding to enhance anthelmintic resistance diagnosis and surveillance of ovine gastrointestinal nematodes. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **14**, 105–117 (2020).
 200. Sepúlveda-Vázquez, J. *et al.* Frequency of sheep farms with anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes in the Mexican Yucatán peninsula. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **24**, 100549 (2021).
 201. Gainza, Y. A. *et al.* Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Brazil: concordance of in vivo and in vitro (RESISTA-Test©) methods. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária.* **30**, (2021).
 202. Nascimento, L. S. *et al.* Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep grazing in irrigated and dry areas in the semiarid region of northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* **53**, 267 (2021).

203. Mondragón-Ancelmo, J. *et al.* Detection of Gastrointestinal Nematode Populations Resistant to Albendazole and Ivermectin in Sheep. *Anim.* **9**, 775 (2019).
204. Santiago-Figueroa, I. *et al.* Anthelmintic resistance in hair sheep farms in a sub-humid tropical climate, in the Huasteca Potosina, Mexico. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **17**, 100292 (2019).
205. Castro-Arnáez, I. C., Montenegro, V. M., Vargas-Leitón, B., Álvarez-Calderón, V. & Soto-Barrientos, N. Anthelmintic resistance in commercial sheep farms in Costa Rica. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **23**, 100506 (2020).
206. Cristel, S. *et al.* Anthelmintic resistance in grazing beef cattle in central and northeastern areas of Argentina - An update. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **9**, 25–28 (2017).
207. Mphahlele, M., Tsoetsi-Khambule, A. M., Moerane, R., Komape, D. M. & Thekiso, O. M. M. Anthelmintic resistance and prevalence of gastrointestinal nematodes infecting sheep in Limpopo Province, South Africa. *Vet. World.* **14**, 302 (2021).
208. Dey, A. R., Begum, N., Anisuzzaman, Alim, M. A. & Alam, M. Z. Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants in Bangladesh. *Parasitol. Int.* **77**, 102105 (2020).
209. Preston, S., Piedrafita, D., Sandeman, M. & Cotton, S. The current status of anthelmintic resistance in a temperate region of Australia; implications for small ruminant farm management. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **17**, 100313 (2019).
210. Cintra, M. C. R., Teixeira, V. N., Nascimento, L. V. & Sotomaior, C. S. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Vet. Parasitol.* **216**, 4–6 (2016).
211. Lamb, J., Elliott, T., Chambers, M. & Chick, B. Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Vet. Parasitol.* **241**, 48–51 (2017).
212. Martins, A. C. *et al.* *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep: Fecal egg count reduction tests and randomized controlled trials. *Semin. Agrar.* **38**, 231–238 (2017).
213. Sales, N. & Love, S. Resistance of *Haemonchus sp.* to monepantel and reduced efficacy of a derquantel / abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. *Vet. Parasitol.* **228**, 193–196 (2016).
214. Scott, I. *et al.* Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* **198**, 166–171 (2013).
215. Soulsby, L. New concepts in strongyle control and anthelmintic resistance: the role of refugia. *Vet. J.* **174**, 6–7 (2007).
216. Hodgkinson, J. E. *et al.* Refugia and anthelmintic resistance: Concepts and challenges. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **10**, 51–57 (2019).
217. Van Wyk, J. A. Refugia - Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **68**, 55–67 (2001).
218. Redman, E. *et al.* The Emergence of resistance to the Benzimidazole anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft selective sweeps. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003494 (2015).
219. Borgsteede, F. H. M. & Duyn, S. P. J. Lack of reversion of a benzimidazole resistant strain of *Haemonchus contortus* after six years of levamisole usage. *Res. Vet. Sci.* **47**, 270–272 (1989).
220. Hall, C. A., Ritchie, L. & Kelly, J. D. Effect of removing anthelmintic selection pressure on the benzimidazole resistance status of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Res. Vet. Sci.* **33**, 54–57 (1982).
221. Herd, R. P., Streitl, R. H., McClure, K. E. & Parker, C. F. Control of hypobiotic and benzimidazole-resistant nematodes of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **184**, 726–730 (1984).
222. Jackson, F. & Coop, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology.* **120**, 95–107 (2000).

223. Martin, P. Development and control of resistance to anthelmintics. *Int. J. Parasitol.* **17**, 493–501 (1987).
224. Waller, P. J., Dobson, R. J. & Axelsen, A. Anthelmintic resistance in the field: Changes in resistance status of parasitic populations in response to anthelmintic treatment. *Aust. Vet. J.* **65**, 376–378 (1988).
225. Waller, P. J. *et al.* Changes in anthelmintic resistance status of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* exposed to different anthelmintic selection pressures in grazing sheep. *Int. J. Parasitol.* **19**, 99–110 (1989).
226. Leathwick, D. M., Ganesh, S. & Waghorn, T. S. Evidence for reversion towards anthelmintic susceptibility in *Teladorsagia circumcincta* in response to resistance management programmes. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **5**, 9–15 (2015).
227. Tamponi, C. *et al.* Preliminary assessment of body condition score as a possible marker for the targeted selective treatment of dairy sheep against gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitol.* **1**, 1–7 (2021).
228. Edith, R., Harikrishnan, T. & Balagangatharathilagar, M. Targeted selective treatment (TST): A promising approach to combat anthelmintic resistance in farm animals. *J. Entomol. Zool. Stud.* **6**, 844–847 (2018).
229. Van Wyk, J. A. & Bath, G. F. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet. Res.* **33**, 509–529 (2002).
230. Walker, J. G. *et al.* Mixed methods evaluation of targeted selective anthelmintic treatment by resource-poor smallholder goat farmers in Botswana. *Vet. Parasitol.* **214**, 80–88 (2015).
231. Maia, D., Rosalinski-Moraes, F., de Torres-Acosta, J. F., Cintra, M. C. R. & Sotomaior, C. S. FAMACHA© system assessment by previously trained sheep and goat farmers in Brazil. *Vet. Parasitol.* **209**, 202–209 (2015).
232. Kaplan, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* **20**, 477–481 (2004).
233. Rodríguez, A. V., Goldberg, V., Viotti, H. & Ciappesoni, G. Early detection of *Haemonchus contortus* infection in sheep using three different faecal occult blood tests. *Open Vet. J.* **5**, 90–97 (2015).
234. Şahin, Ö. *et al.* Relationships between FAMACHA© scores and parasite incidence in sheep and goats. *Trop. Anim. Health Prod.* **53**, 1–9 (2021).
235. Kenyon, F. *et al.* A comparative study of the effects of four treatment regimes on ivermectin efficacy, body weight and pasture contamination in lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes in Scotland. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **3**, 77–84 (2013).
236. Vercruysse, J. *et al.* Control of helminth ruminant infections by 2030. *Parasitology.* **145**, 1655–1664 (2018).
237. Greer, A. W., Van Wyk, J. A., Hamie, J. C., Byaruhanga, C. & Kenyon, F. Refugia-based strategies for parasite control in livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **36**, 31–43 (2020).
238. Bartram, D. J., Leathwick, D. M., Taylor, M. A., Geurden, T. & Maeder, S. J. The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. *Vet. Parasitol.* **186**, 151–158 (2012).
239. Geary, T. G. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. *Vet. Parasitol.* **190**, 306–316 (2012).
240. Dobson, R. J. *et al.* Minimising the development of anthelmintic resistance, and optimising the use of the novel anthelmintic monepantel, for the sustainable control of nematode parasites in Australian sheep grazing systems. *Aust. Vet. J.* **89**, 160–166 (2011).
241. Leathwick, D. M., Waghorn, T. S., Miller, C. M., Candy, P. M. & Oliver, A. M. B. Managing anthelmintic resistance - Use of a combination anthelmintic and leaving some lambs untreated to

- slow the development of resistance to ivermectin. *Vet. Parasitol.* **187**, 285–294 (2012).
242. Canton, C. *et al.* Resistant nematodes in cattle: Pharmaco-therapeutic assessment of the ivermectin- ricobendazole combination. *Vet. Parasitol.* **234**, 40–48 (2017).
243. Geary, T. G., Thompson, D. P. & Klein, R. D. Mechanism-based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *Int. J. Parasitol.* **29**, 105–112 (1999).
244. Bartram, D. J. Multiple-active anthelmintic formulations: Friend or foe in sustainable parasite control?. *Small Rumin. Res.* **110**, 96–99 (2013).
245. Leathwick, D. M. Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in combination. *Vet. Parasitol.* **186**, 93–100 (2012).
246. Leathwick, D. M. & Besier, R. B. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia-Strategies and experiences. *Vet. Parasitol.* **204**, 44–54 (2014).
247. Lanusse, C. *et al.* Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants. *Trends Parasitol.* **34**, 664–682 (2018).
248. Sargison, N. D. Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep-Future of anthelmintic drugs. *Vet. Parasitol.* **189**, 79–84 (2012).
249. Stear, M. J., Doligalska, M. & Donskow-Schmelter, K. Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology.* **134**, 139–151 (2007).
250. Szewc, M., De Waal, T. & Zintl, A. Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *Vet. J.* **268**, 105602 (2021).
251. Claerebout, E. & Geldhof, P. Helminth vaccines in ruminants: From development to application. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* **36**, 159–171 (2020).
252. Dilrukshi Jayawardene, K. L. T., Palombo, E. A. & Boag, P. R. Natural products are a promising source for anthelmintic drug discovery. *Biomol.* **11**, 1457 (2021).
253. Janssen, P. A. The levamisole story. *Progress in Drug Research.* **20**, 347–383 (1976).
254. Sasaki, T. *et al.* A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *J. Antibiot.* **45**, 692–697 (1992).
255. Powers, K. G., Wood, I. B., Eckert, J., Gibson, T. & Smith, H. J. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Vet. Parasitol.* **10**, 265–284 (1982).
256. Wood, I. B. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* **58**, 181–213 (1995).
257. Taylor, M. A., Hunt, K. R. & Goodyear, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* **103**, 183–194 (2002).
258. Presidente, P. J. A. Methods for detection of resistance to anthelmintics. in *Resistance in nematodes to anthelmintic drugs* (eds. Anderson, N. & Waller, P. J.) 13–27 (CSIRO and Australian Wool Corporation Technical Publication, 1985).
259. Coles, G. C. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **44**, 35–44 (1992).
260. Sangster, N. C. *et al.* *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. *Res. Vet. Sci.* **27**, 106–110 (1979).
261. Martin, P. J., Anderson, N. & Jarrett, R. G. Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. *Aust. Vet. J.* **62**, 38–43 (1985).
262. Chalmers, K. Detection of benzimidazole resistant *Nematodirus spathiger*. *N. Z. Vet. J.* **33**, 53–53

- (1985).
263. Levecke, B., Dobson, R. J., Speybroeck, N., Vercruyssen, J. & Charlier, J. Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **188**, 391–396 (2012).
 264. Nielsen, M. K. What makes a good fecal egg count technique?. *Vet. Parasitol.* **296**, 109509 (2021).
 265. Grimshaw, W. T. R., Hong, C. & Hunt, K. R. Potential for misinterpretation of the faecal egg count reduction test for levamisole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep. *Vet. Parasitol.* **62**, 267–273 (1996).
 266. Zamanian, M. & Chan, J. D. High-content approaches to anthelmintic drug screening. *Trends Parasitol.* **37**, 780–789 (2021).
 267. Flecknell, P. Replacement, Reduction, Refinement . *ALTEX.* **19**, 73–78 (2002).
 268. Eckert, J. Alternatives to animal experimentation in parasitology. *Vet. Parasitol.* **71**, 99–120 (1997).
 269. Geary, T. G., Sakanari, J. A. & Caffrey, C. R. Anthelmintic drug discovery: Into the future. *J. Parasitol.* **101**, 125–133 (2015).
 270. Geary, T. G. *Haemonchus contortus*: Applications in drug discovery. *Adv. Parasitol.* **93**, 429–463 (2016).
 271. Le Jambre, L. F. Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* **2**, 385–391 (1976).
 272. Escala, N. *et al.* Synthesis, bioevaluation and docking studies of some 2-phenyl-1H-benzimidazole derivatives as anthelmintic agents against the nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Eur. J. Med. Chem.* **208**, 112554 (2020).
 273. Chagas, A. C. S. *et al.* Efficacy of essential oils from plants cultivated in the Amazonian Biome against gastrointestinal nematodes in sheep. *J. Parasit. Dis.* **42**, 357–364 (2018).
 274. Maestrini, M., Molento, M. B., Forzan, M. & Perrucci, S. In vitro anthelmintic activity of an aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* and of glycyrrhetic acid against gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Parasite.* **28**, 64 (2021).
 275. Maestrini, M., Tava, A., Mancini, S., Tedesco, D. & Perrucci, S. *In vitro* anthelmintic activity of *Saponins* from *Medicago spp.* against sheep gastrointestinal nematodes. *Mol.* **25**, 242 (2020).
 276. Zajíčková, M. *et al.* Assessing the anthelmintic candidates BLK127 and HBK4 for their efficacy on *Haemonchus contortus* adults and eggs, and their hepatotoxicity and biotransformation. *Pharm.* **14**, 754 (2022).
 277. Von Samson-Himmelstjerna, G. *et al.* Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Res.* **105**, 825–834 (2009).
 278. Coles, G. C. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **136**, 167–185 (2006).
 279. Rinaldi, L., Coles, G. C., Maurelli, M. P., Musella, V. & Cringoli, G. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* **177**, 345–352 (2011).
 280. Sengupta, M. E., Thapa, S., Thamsborg, S. M. & Mejer, H. Effect of vacuum packing and temperature on survival and hatching of strongyle eggs in faecal samples. *Vet. Parasitol.* **217**, 21–24 (2016).
 281. Ferreira, L. E., Castro, P. M. N., Chagas, A. C. S., França, S. C. & Belebony, R. O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Exp. Parasitol.* **134**, 327–332 (2013).
 282. Martin, P. J. & Le Jambre, L. F. Larval paralysis as an *in vitro* assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. *Vet. Sci. Commun.* **3**, 159–164 (1979).

283. Kotze, A. C., Clifford, S., O'Grady, J., Behnke, J. M. & McCarthy, J. S. An *in vitro* larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides* species. *Am. J. Trop. Med.* **71**, 608–616 (2004).
284. Wimmersberger, D., Tritten, L. & Keiser, J. Development of an *in vitro* drug sensitivity assay for *Trichuris muris* first-stage larvae. *Parasites & Vectors.* **6**, 1–8 (2013).
285. Preston, S. *et al.* Practical and low cost whole-organism motility assay: A step-by-step protocol. *Mol. Cell. Probes.* **30**, 13–17 (2016).
286. White, W. H. *et al.* *In vitro* and *in vivo* characterization of p-amino-phenethyl-m-trifluoromethylphenyl piperazine (PAPP), a novel serotonergic agonist with anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* **146**, 58–65 (2007).
287. D'almeida, R. E., Alberto, M. R., Morgan, P., Sedensky, M. & Isla, M. I. Effect of structurally related flavonoids from *Zuccagnia punctata* Cav. on *Caenorhabditis elegans*. *Acta Parasitol.* **60**, 164–172 (2015).
288. Preston, S. *et al.* Screening of the 'Pathogen Box' identifies an approved pesticide with major anthelmintic activity against the barber's pole worm. *Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist.* **6**, 329–334 (2016).
289. Preston, S. *et al.* Screening of the 'Open Scaffolds' collection from Compounds Australia identifies a new chemical entity with anthelmintic activities against different developmental stages of the barber's pole worm and other parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **7**, 286–294 (2017).
290. Demeler, J. *et al.* Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Vet. Parasitol.* **174**, 58–64 (2010).
291. Demeler, J., Kleinschmidt, N., Küttler, U., Koopmann, R. & von Samson-Himmelstjerna, G. Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. *Parasitol. Int.* **61**, 614–618 (2012).
292. D'Assonville, J. A., Janovsky, E. & Verster, A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. *Vet. Parasitol.* **61**, 73–80 (1996).
293. Kotze, A. C., Le Jambre, L. F. & O'Grady, J. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. *Vet. Parasitol.* **137**, 294–305 (2006).
294. Zangueu, C. B. *et al.* *In vitro* effects of aqueous extract from *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell stem bark on egg hatching, larval migration and adult worms of *Haemonchus contortus*. *BMC Vet. Res.* **14**, 1–11 (2018).
295. Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I. & Hoste, H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology.* **131**, 531–538 (2005).
296. Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J. & Hoste, H. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Vet. Parasitol.* **153**, 313–319 (2008).
297. Coles, G. C., Tritschler, J. P., Giordano, D. J., Laste, N. J. & Schmidt, A. L. Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. *Res. Vet. Sci.* **45**, 50–53 (1988).
298. Hubert, J. & Kerboeuf, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* **130**, 442–446 (1992).
299. Taylor, M. A. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. *Res. Vet. Sci.* **49**, 198–202 (1990).
300. Gill, J. H., Redwin, J. M., Van Wyk, J. A. & Lacey, E. Avermectin inhibition of larval development in

- Haemonchus contortus-effects of ivermectin resistance. *Int. J. Parasitol.* **25**, 463–470 (1995).
301. Raza, A., Lamb, J., Chambers, M., Hunt, P. W. & Kotze, A. C. Larval development assays reveal the presence of sub-populations showing high- and low-level resistance in a monepantel (Zolvix®)-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **220**, 77–82 (2016).
 302. Molan, A. L., Waghorn, G. C. & McNabb, W. C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Vet. Rec.* **150**, 65–69 (2002).
 303. Molan, A.-L. & Faraj, A. M. the effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: trichostrongylidae). *Folia Parasitol.* **57**, 62–68 (2010).
 304. Eguale, T., Tadesse, D. & Giday, M. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *J. Ethnopharmacol.* **137**, 108–113 (2011).
 305. Campbell, B. E. *et al.* Norcantharidin analogues with nematocidal activity in *Haemonchus contortus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 3277–3281 (2011).
 306. O’Grady, J. & Kotze, A. C. *Haemonchus contortus*: *in vitro* drug screening assays with the adult life stage. *Exp. Parasitol.* **106**, 164–172 (2004).
 307. Hounzangbe-Adote, M. S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K. & Hoste, H. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* **78**, 155–160 (2005).
 308. Bennett, J. L. & Pax, R. A. Micromotility meter: an instrument designed to evaluate the action of drugs on motility of larval and adult nematodes. *Parasitology.* **93**, 341–346 (1986).
 309. Richards, J. C., Behnke, J. M. & Duce, I. R. *In vitro* studies on the relative sensitivity to ivermectin of *Necator americanus* and *Ancylostoma ceylanicum*. *Int. J. Parasitol.* **25**, 1185–1191 (1995).
 310. Bachaya, H. A., Iqbal, Z., Khan, M. N., Sindhu, Z. ud D. & Jabbar, A. Anthelmintic activity of *Ziziphium nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against Trichostrongylid nematodes of sheep. *J. Ethnopharmacol.* **123**, 325–329 (2009).
 311. Hoste, H. *et al.* Compared *in vitro* anthelmintic effects of eight tannin-rich plants browsed by goats in the southern part of France. *Options Méditerranéennes.* **85**, 431–436 (2009).
 312. Marie-Magdeleine, C., Hoste, H., Mahieu, M., Varo, H. & Archimede, H. *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **161**, 99–105 (2009).
 313. Wangchuk, P. *et al.* Compounds derived from the *Bhutanese daisy*, *Ajania nubigena*, demonstrate dual anthelmintic activity against *Schistosoma mansoni* and *Trichuris muris*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
 314. Jiao, Y. *et al.* Screening of the ‘Stasis Box’ identifies two kinase inhibitors under pharmaceutical development with activity against *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors.* **10**, 1–7 (2017).
 315. Cowan, N., Raimondo, A. & Keiser, J. Approved oncology drugs lack *in vivo* activity against *Trichuris muris* despite *in vitro* activity. *Parasitol. Res.* **115**, 4443–4446 (2016).
 316. Le, T. G. *et al.* Optimization of novel 1-Methyl-1 H-Pyrazole-5-carboxamides leads to high potency larval development inhibitors of the barber’s pole worm. *J. Med. Chem.* **61**, 10875–10894 (2018).
 317. Mayana Beserra de Oliveira, L. *et al.* Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus* Efeito de seis extratos de plantas taniníferas tropicais sobre o desembainhamento larvar de *Haemochus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* **20**, 155–160 (2011).
 318. Hördegen, P., Cabaret, J., Hertzberg, H., Langhans, W. & Maurer, V. *In vitro* screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay. *J. Ethnopharmacol.* **108**, 85–89 (2006).
 319. Mitsui, Y. & Kato, K. Application of non-fluorescent dyes to assess the antischistosomal effect of

- antimalarial drugs on *Schistosoma mansoni* adult worms. *Jpn. J. Infect. Dis.* **71**, 382–387 (2018).
320. Jasmer, D. P., Rosa, B. A., Tyagi, R. & Mitreva, M. Rapid determination of nematode cell and organ susceptibility to toxic treatments. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **14**, 167–182 (2020).
321. Preston, S. *et al.* Low cost whole-organism screening of compounds for anthelmintic activity. *Int. J. Parasitol.* **45**, 333–343 (2015).
322. Folz, S. D. *et al.* Detecting *in vitro* anthelmintic effects with a micromotility meter. *Vet. Parasitol.* **24**, 241–250 (1987).
323. Varady, M. & Corba, J. Comparison of six *in vitro* tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Vet. Parasitol.* **80**, 239–249 (1999).
324. Lockery, S. R. *et al.* A microfluidic device for whole-animal drug screening using electrophysiological measures in the nematode *C. elegans*. *Lab Chip* **12**, 2211 (2012).
325. Hahnel, S. R., Dilks, C. M., Heisler, I., Andersen, E. C. & Kulke, D. *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research - Old model, new perspectives. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **14**, 237–248 (2020).
326. Sepúlveda-Crespo, D., Reguera, R. M., Rojo-Vázquez, F., Balaña-Fouce, R. & Martínez-Valladares, M. Drug discovery technologies: *Caenorhabditis elegans* as a model for anthelmintic therapeutics. *Med. Res. Rev.* **40**, 1715–1753 (2020).
327. Weeks, J. C. *et al.* Microfluidic platform for electrophysiological recordings from host-stage hookworm and *Ascaris suum* larvae: A new tool for anthelmintic research. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **6**, 314–328 (2016).
328. Paveley, R. A. & Bickle, Q. D. Automated imaging and other developments in whole-organism anthelmintic screening. *Parasite Immunol.* **35**, 302–313 (2013).
329. Buckingham, S. D., Partridge, F. A. & Sattelle, D. B. Automated, high-throughput, motility analysis in *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes: Applications in the search for new anthelmintics. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **4**, 226–232 (2014).
330. Comley, J. C. W., Townson, S., Rees, M. J. & Dobinson, A. The further application of MTT-formazan colorimetry to studies on filarial worm viability. *Trop. Med. Parasitol.* **40**, 311–316 (1989).
331. Comley, J. C., Rees, M. J., Turner, C. H. & Jenkins, D. C. Colorimetric quantitation of filarial viability. *Int. J. Parasitol.* **19**, 77–83 (1989).
332. James, C. E. & Davey, M. W. A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes *in vitro*. *Parasitol. Res.* **101**, 975–980 (2007).
333. Mukherjee, M., Misra, S. & Chatterjee, R. K. Development of *in vitro* screening system for assessment of antifilarial activity of compounds. *Acta Trop.* **70**, 251–255 (1998).
334. Lai, Y. *et al.* A novel high-throughput nematicidal assay using embryo cells and larvae of *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Parasitol.* **139**, 33–41 (2014).
335. Phiri, A. M., De Pomerai, D. I., Buttle, D. J. & Behnke, J. M. A novel assay for the detection of anthelmintic activity mediated by cuticular damage to nematodes: Validation on *Caenorhabditis elegans* exposed to cysteine proteinases. *Parasitology.* **144**, 583–593 (2017).
336. Cintra, G. A. S., Neto, B. A. D., Carvalho, P. H. P. R., Moraes, C. B. & Freitas-Junior, L. H. Expanding the biological application of fluorescent benzothiadiazole derivatives: A phenotypic screening strategy for anthelmintic drug discovery using *Caenorhabditis elegans*. *SLAS Discov.* **24**, 755–765 (2019).
337. Ferreira, S. R. *et al.* A new methodology for evaluation of nematode viability. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1-7 (2015).
338. Simonetta, S. H. & Golombek, D. A. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J. Neurosci. Methods.* **161**, 273–280 (2007).

339. Liu, M., Landuyt, B., Klaassen, H., Geldhof, P. & Luyten, W. Screening of a drug repurposing library with a nematode motility assay identifies promising anthelmintic hits against *Cooperia oncophora* and other ruminant parasites. *Vet. Parasitol.* **265**, 15–18 (2019).
340. Taki, A. C. *et al.* High-throughput phenotypic assay to screen for anthelmintic activity on *Haemonchus contortus*. *Pharm.* **14**, 616 (2021).
341. Taki, A. C., Byrne, J. J., Boag, P. R., Jabbar, A. & Gasser, R. B. Practical high-throughput method to screen compounds for anthelmintic activity against *Caenorhabditis elegans*. *Molecules.* **26**, 4156 (2021).
342. Andersen, E. C. *et al.* A powerful new quantitative genetics platform, combining *Caenorhabditis elegans* high-throughput fitness assays with a large collection of recombinant strains. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **5**, 911–920 (2015).
343. Partridge, F. A. *et al.* 2,4-Diaminothieno[3,2-d]pyrimidines, a new class of anthelmintic with activity against adult and egg stages of whipworm. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006487 (2018).
344. Herath, H. M. P. D. *et al.* Whole-organism phenotypic screening methods used in early-phase anthelmintic drug discovery. *Biotechnol. Adv.* **57**, 107937 (2022).
345. Manneck, T., Braissant, O., Haggemüller, Y. & Keiser, J. Isothermal microcalorimetry to study drugs against *Schistosoma mansoni*. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1217–1225 (2011).
346. Keiser, J., Manneck, T., Kirchhofer, C. & Braissant, O. Isothermal microcalorimetry to study the activity of triclabendazole and its metabolites on juvenile and adult *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* **133**, 265–268 (2013).
347. Smout, M. J., Kotze, A. C., McCarthy, J. S. & Loukas, A. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e885 (2010).
348. Rinaldi, G., Loukas, A., Brindley, P. J., Irelan, J. T. & Smout, M. J. Viability of developmental stages of *Schistosoma mansoni* quantified with xCELLigence worm real-time motility assay (xWORM). *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **5**, 141–148 (2015).
349. Buckingham, S. D. & Sattelle, D. B. Fast, automated measurement of nematode swimming (thrashing) without morphometry. *BMC Neurosci.* **10**, 1–6 (2009).
350. Marcellino, C. *et al.* WormAssay: A Novel Computer Application for Whole-Plate Motion-based Screening of Macroscopic Parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1494 (2012).
351. Storey, B. *et al.* Utilization of computer processed high definition video imaging for measuring motility of microscopic nematode stages on a quantitative scale: ‘The Worminator’. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **4**, 233–243 (2014).
352. Abongwa, M. *et al.* Filaricidal activity of *Daniellia oliveri* and *Psorospermum febrifugum* extracts. *Parasites & Vectors.* **14**, 305 (2021).
353. Partridge, F. A. *et al.* An automated high-throughput system for phenotypic screening of chemical libraries on *C. elegans* and parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **8**, 8–21 (2017).
354. Mathew, M. D., Mathew, N. D. & Ebert, P. R. WormScan: A technique for high-throughput phenotypic analysis of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* **7**, e33483 (2012).
355. Stroustrup, N. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* Lifespan Machine. *Nat. Methods.* **10**, 665–670 (2013).
356. Mathew, M. D. *et al.* Using *C. elegans* forward and reverse genetics to identify new compounds with anthelmintic activity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0005058 (2016).
357. Puckering, T. *et al.* Automated Wormscan. *F1000Research.* **6**, 192 (2019).
358. Ge, A. *et al.* Profile analysis of *C. elegans* rheotaxis behavior using a microfluidic device. *Lab Chip.* **19**, 475–483 (2019).
359. Atakan, H. B. *et al.* Automated Platform for Long-Term Culture and High-Content Phenotyping of

- Single *C. elegans* Worms. *Sci. Reports.* **9**, 1–14 (2019).
360. Ding, X. *et al.* Effective drug combination for *Caenorhabditis elegans* nematodes discovered by output-driven feedback system control technique. *Sci. Adv.* **3**, eaao1254 (2017).
361. Jiao, Y. *et al.* A perspective on the discovery of selected compounds with anthelmintic activity against the barber's pole worm—Where to from here?. *Adv. Parasitol.* **108**, 1–45 (2020).
362. Taman, A. & Azab, M. Present-day anthelmintics and perspectives on future new targets. *Parasitol. Res.* **113**, 2425–2433 (2014).
363. DiMasi, J. A., Grabowski, H. G. & Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J. Health Econ.* **47**, 20–33 (2016).
364. Preston, S., Jabbar, A. & Gasser, R. B. A perspective on genomic-guided anthelmintic discovery and repurposing using *Haemonchus contortus*. *Infect. Genet. Evol.* **40**, 368–373 (2016).
365. Taylor, C. M. *et al.* Discovery of anthelmintic drug targets and drugs using chokepoints in nematode metabolic pathways. *PLoS Pathog.* **9**, e1003505 (2013).
366. Tyagi, R. *et al.* Small molecule inhibitors of metabolic enzymes repurposed as a new class of anthelmintics. *ACS Infect. Dis.* **4**, 1130–1145 (2018).
367. Camp, D., Newman, S., Pham, N. & Quinn, R. Nature Bank and the Queensland Compound Library: unique international resources at the Eskitis Institute for Drug Discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **17**, 201–209 (2014).
368. Le, T. G. *et al.* Novel 1-Methyl-1 H-pyrazole-5-carboxamide derivatives with potent anthelmintic activity. *J. Med. Chem.* **62**, 3367–3380 (2019).
369. Nguyen, L. T. *et al.* Phenotypic screening of the 'Kurz-box' of chemicals identifies two compounds (BLK127 and HBK4) with anthelmintic activity in vitro against parasitic larval stages of *Haemonchus contortus*. *Parasit. Vectors* **12**, 191 (2019).
370. Burns, A. R. *et al.* *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
371. Partridge, F. A. *et al.* Dihydrobenz[e][1,4]oxazepin-2(3H)-ones, a new anthelmintic chemotype immobilising whipworm and reducing infectivity in vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005359 (2017).
372. Panic, G., Duthaler, U., Speich, B. & Keiser, J. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. *Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist.* **4**, 185–200 (2014).
373. O'Connor, K. A. & Roth, B. L. Finding new tricks for old drugs: An efficient route for public-sector drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 1005–1014 (2005).
374. Keiser, J. *et al.* Evaluation of an FDA approved library against laboratory models of human intestinal nematode infections. *Parasites & Vectors.* **9**, 1–10 (2016).
375. Le, T. G. *et al.* Structure-activity relationship studies of Tolfenpyrad reveal subnanomolar Inhibitors of *Haemonchus contortus* development. *J. Med. Chem.* **62**, 1036–1053 (2019).
376. Le, T. G. *et al.* Novel 1-Methyl-1 H-pyrazole-5-carboxamide Derivatives with potent anthelmintic activity. *J. Med. Chem.* **62**, 3367–3380 (2019).
377. Huang, J. *et al.* Gene replacement for the generation of designed novel avermectin derivatives with enhanced acaricidal and nematicidal activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 5326–5334 (2015).
378. Fei, C. *et al.* Safety and clinical efficacy of tenvermectin, a novel antiparasitic 16-membered macrocyclic lactone antibiotics. *Eur. J. Pharm. Sci.* **117**, 154–160 (2018).
379. Gutiérrez, E. L., Souza, M. S., Diniz, L. F. & Ellena, J. Synthesis, characterization and solubility of a new anthelmintic salt: Mebendazole nitrate. *J. Mol. Struct.* **1161**, 113–121 (2018).
380. García, A. *et al.* Synthesis and characterization of a new cyclodextrin derivative with improved

properties to design oral dosage forms. *Drug Deliv. Transl. Res.* **9**, 273–283 (2019).

OBJETIVOS

El **Objetivo General de la presente Tesis Doctoral** consiste en desarrollar nuevos compuestos con utilidad terapéutica frente a las infecciones ovinas por tricostrongídeos que puedan ayudar a resolver los problemas de resistencias a los fármacos de uso habitual. Por lo tanto, los objetivos específicos serán los siguientes:

- ✓ Evaluar el nivel de resistencia a los BZs en rebaños de ovejas pertenecientes a la Comunidad Autónoma de Castilla y León mediante técnicas *in vivo*, *in vitro* y moleculares.
- ✓ Estudiar la actividad antihelmíntica de nuevos compuestos sintéticos sobre huevos y larvas de *T. circumcincta* y su toxicidad mediante diferentes ensayos *in vitro*.
- ✓ Estudiar la actividad antihelmíntica *in vitro* de compuestos sintéticos de distinta naturaleza sobre larvas y adultos de *T. muris* y *H. polygyrus*.
- ✓ Evaluar la toxicidad y seguridad de los candidatos seleccionados para el desarrollo de fármacos AHs en ratones.
- ✓ Evaluar la toxicidad, seguridad y actividad antihelmíntica de los candidatos seleccionados para el desarrollo de fármacos AHs en jerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) y ovejas infectadas con *H. contortus*.
- ✓ Poner a punto una plataforma de alto rendimiento para el cribado automatizado de compuestos frente *T. circumcincta* y *H. contortus*.

CAPÍTULO I

Teladorsagia circumcincta beta tubulin: the presence of the E198L polymorphism on its own is associated with benzimidazole resistance

María Martínez-Valladares, **Elora Valderas-García**, Javier Gandasegui, Philip Skuce, Alison Morrison, Verónica Castilla Gómez de Agüero, Maria Cambra-Pellejà, Rafael Balaña-Fouce & Francisco A. Rojo-Vázquez.

Published: Parasites & Vectors

Received 13 May 2020 / Accepted 30 August 2020/ Published 07 September 2020

[DOIhttps://doi.org/10.1186/s13071-020-04320-x](https://doi.org/10.1186/s13071-020-04320-x)

ABSTRACT

Background: Benzimidazole resistance is associated with isotype-1 β -tubulin gene F200Y, E198A and F167Y SNPs. In this study, the recently described polymorphism E198L was reported and analysed in *Teladorsagia circumcincta*.

Methods: The benzimidazole phenotypic resistance was measured by the faecal egg count reduction test (FECRT) and the egg hatch test (EHT) using a discriminating dose (DD) in 39 sheep flocks. Around 1,000 larvae collected before and after treatment were used for DNA extraction. The resistant species identified in all flocks was *T. circumcincta*. The resistance allele's frequencies were measured for F200Y and E198A. A 371-bp fragment of the isotype-1 β -tubulin gene was analysed, including the three codons of interest, and a new pyrosequencing assay was designed for testing E198L.

Results: The percentage of resistant flocks was 35% by FECRT or 26% by EHT; however, F200Y and E198A SNPs were absent in *T. circumcincta*. The amplification of a 371-bp fragment confirmed the absence of F167Y and F200Y in 6 resistant flocks. Regarding codon 198, all samples after treatment carried a leucine (CTA). A pyrosequencing assay analysed the allele frequencies for the first two bases at codon 198 independently, G/C and A/T. The correlation between C and T frequencies was almost 1 ($r = 0.929$, $P < 0.0001$) and the mean value of both was calculated to measure the leucine frequency; this value ranged between 10.4–80.7% before treatment, and 82.3–92.8% after treatment. High and similar correlations were reported between the genotypic variables (C frequency, T frequency or mean of both frequencies) and phenotypic resistance ($r > 0.720$, $P < 0.0001$), although negatively associated with the FECRT and positively with the EHT. According to multivariate linear regression analysis, the T frequency was the most significant variable influencing the phenotypic resistance (FECRT or EHT; $P < 0.0001$). In the EHT, 67.1% of the phenotypic variability is associated with the T frequency but in the FECRT only 33.4%; therefore, the EHT using a DD seems to detect the genotypic resistance more accurately than the FECRT.

Conclusions: The E198L polymorphism can confer BZ resistance on its own in *T. circumcincta*.

CAPÍTULO II

Anthelmintic activity of aminoalcohol and diamine derivatives against the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*

Elora Valderas-García*, Jennifer de la Vega*, María Álvarez Bardón, Verónica Castilla Gómez de Agüero, Ricardo Escarcena, José Luis López-Pérez, Francisco A. Rojo-Vázquez, Arturo San Feliciano, Esther del Olmo, Rafael Balaña-Fouce, María Martínez-Valladares

*both authors contributed equally to this study

Published: Veterinary Parasitology

Published August 2021

DOI: 10.1016/j.vetpar.2021.109496

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes (GIN) infections are a serious problem in livestock production due to the great economic losses they cause. Their control is increasingly difficult because of the rapid development of drug resistance and the limited number of available drugs. Therefore, this study evaluated 18 aminoalcohol and 16 diamine derivatives against eggs, first and third stage larvae from a susceptible and a resistant isolate of *Teladorsagia circumcincta* collected from sheep. The effectiveness of the *in vitro* anthelmintic activity of the compounds was evaluated using three different procedures: Egg Hatch Test (EHT), Larval Mortality Test (LMT) and Larval Migration Inhibition Test (LMIT). Those compounds with activities higher than 90 % in the initial screening at 50 μM were selected to determine their half maximal effective concentration (ED_{50}). In parallel, cytotoxicity assays were conducted on Caco2 and HepG2 cell lines to calculate Selectivity Indexes (SIs) for each compound. The diamine **30** presented the best results in preventing egg hatching, displaying the lowest ED_{50} value ($1.01 \pm 0.04 \mu\text{M}$) of all compounds tested and the highest SI (21.21 vs. Caco-2 cells). For the LMIT, the diamine **34** showed the highest efficacy, with ED_{50} values of 2.67 ± 0.08 and $3.02 \pm 0.09 \mu\text{M}$ on the susceptible and resistant isolate of the parasite, respectively.

CAPÍTULO III

Novel compound shows in vivo anthelmintic activity in gerbils and sheep infected by Haemonchus contortus

Elora Valderas-García*, Nerea Escala*, Verónica Castilla Gómez de Agüero, Maria Cambra Pellejà, Laura González del Palacio, Raquel Vallejo García, Jennifer de la Vega, Arturo San Feliciano, Esther del Olmo, María Martínez-Valladares, Rafael Balaña-Fouce.

*both authors contributed equally to this study

ABSTRACT

The control of gastrointestinal nematodes (GIN) in livestock is becoming increasingly difficult due to the limited number of available drugs and the rapid development of anthelmintic resistance. Therefore, it is imperative to develop new anthelmintics that are effective against nematodes. Under this context, we tested the potential toxicity of three compounds in mice and their potential anthelmintic efficacy in Mongolian gerbils infected with *H. contortus*. The compounds were selected from previous *in vitro* experiments: two diamine (AAD-1 and AAD-2) and one benzimidazole (BZ-42) derivatives. BZ-42 was also selected to test its efficacy in sheep. In Mongolian gerbils, the benzimidazole reduced the percentage of pre-adults present in the stomach of gerbils by 95% at a dose of 200 mg/kg. In sheep, there was a 99% reduction in the number of eggs shed in faeces after seven days at a dose of 120 mg/kg and a 95% reduction in the number of adults present in the abomasum. In conclusion, BZ-42 could be considered a promising candidate for the treatment of helminth infections in small ruminants.

CAPÍTULO IV

Benzimidazole and aminoalcohol derivatives show in vitro anthelmintic activity against Trichuris muris and Heligmosomoides polygyrus

Elora Valderas-García, Cécile Häberli, María Álvarez Bardón, Nerea Escala, Verónica Castilla Gómez de Agüero, Jennifer de la Vega, Esther del Olmo, Rafael Balaña-Fouce, Jennifer Keiser, María Martínez-Valladares.

Submitted to Parasites & Vectors

ABSTRACT

Background: Infections by gastrointestinal nematodes cause significant economic losses and disease in both human and animals worldwide. The discovery of novel anthelmintic drugs is crucial for maintaining control of these parasitic infections.

Methods: For this purpose, the aim of the present study was to evaluate the potential anthelmintic activity of three series of compounds against the gastrointestinal nematodes *Trichuris muris* and *Heligmosomoides polygyrus* *in vitro*. The compounds tested were derivatives of benzimidazole, lipidic aminoalcohols and diamines. A primary screening was performed to select those compounds with an ability to inhibit *T. muris* L₁ motility by more than 90% at a single concentration of 100 μ M, and then, their respective ED₅₀ values were calculated. Those compounds with ED₅₀ lower than 10 μ M were also tested against the adult stage of *T. muris* and *H. polygyrus* at a single concentration of 10 μ M.

Results: Of the 41 initial compounds screened, only compounds AO14, BZ6 and BZ12 had ED₅₀ values lower than 10 μ M on *T. muris* L₁ assay, showing ED₅₀ values of 3.30, 8.89 and 4.17 μ M, respectively. However, only two of them displayed activity against the adult stage of the parasites: BZ12 killed 81% of adults of *T. muris* (ED₅₀ of 8.1 μ M) and 53% of *H. polygyrus* while BZ6 killed 100% of *H. polygyrus* adults (ED₅₀ of 5.3 μ M) but only 17% of *T. muris*.

Conclusions: BZ6 and BZ12 could be considered as potential candidates for further *in vivo* efficacy testing.

Keywords: *Trichuris muris*, *Heligmosomoides polygyrus*, anthelmintic, benzimidazole, diamine, aminoalcohol.

CAPÍTULO V

Screening for compounds with anthelmintic activity in Heamonchus contortus and Teladorsagia circumcincta using motility measurement

Elora Valderas-García*, Alena Kadlecová*, Dominik Vitek, Ota Blahoušek, Matthew Lacey, Rafael Balaña-Fouce, María Martínez-Valladares, Jiří Voller.

*both authors contributed equally to this study

Submitted to JoVE Journal

ABSTRACT

The current repertoire of anthelmintics is limited, moreover drug resistance was observed to almost all of their main classes. Efficient methods of novel drug identification are therefore highly desirable, especially if they allow for high-throughput format. One such modern method is the evaluation of worm motility in liquid cultures using the locomotor activity recording system wMicroTracker. The instrument evaluates the movement by counting how many times the infrared light beams passing through the wells of microtitre plate are interrupted by moving worms. Here we describe how we use this platform for testing candidate drugs on infectious stage of important parasites in ruminants, *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. The presented protocol starts with the coproculture of feces to obtain infectious third stage larvae (L₃) and includes the preparation of L₃ for their testing by cuticle exsheathment. The main advantages over automated microscopy include: lower cost and space requirements of the instrumentation, concurrent measurement of all wells of a microtiter plate, and ease of data analysis.

DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por NGI en rumiantes conllevan importantes pérdidas económicas en la ganadería debido al impacto negativo directo que causan sobre los animales a través de la reducción de la ingesta de alimento, peso, crecimiento de la lana, fertilidad y producción de leche ¹.

En la UE, el coste anual de las infecciones provocadas por helmintos se estima que se sitúa en torno a los 2,1 billones de euros, alcanzando los 357 millones de euros únicamente en ovejas ². Del total, se calcula que el 81% de estos costes se deben a las pérdidas de la producción y el 19% al coste del tratamiento AH ². En cuanto a las pérdidas originadas en ovino y bovino se propone que pueden alcanzar los miles de millones de dólares en todo el mundo ³. Se han propuesto varios métodos para controlar este tipo de infecciones sin depender exclusivamente de fármacos, como la gestión del pastoreo y el control biológico de los pastos, la suplementación nutricional, la vacunación y los enfoques genéticos mediante la cría selectiva ^{4,5}. Todas estas estrategias no químicas son especialmente importantes para prevenir la infección, sin embargo, cuando la tasa de infección aumenta rápidamente, es necesario llevar a cabo tratamientos AHs eficaces y rápidos. Por esta razón, la quimioterapia sigue siendo el pilar central para el control de todas las helmintiasis, incluidas las producidas por NGI ⁶. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el número de fármacos disponibles en el mercado es limitado y que su eficacia se está viendo amenazada cada vez más por la creciente aparición de fallos terapéuticos a nivel global, especialmente en los NGI de rumiantes ^{7,8}, amenazando la economía de las industrias ganaderas, así como la salud y el bienestar de los animales ⁸⁻¹⁰.

La prevalencia de la RA ha aumentado en todo el mundo, y cabe esperar un mayor incremento debido a la administración masiva de fármacos, que induce una presión farmacológica para seleccionar alelos relacionados con la resistencia ^{7,11}. En la

mayoría de los países, los casos de RA se refieren principalmente a la familia de los BZs, con un número creciente de explotaciones resistentes a las LMs, en particular a la ivermectina, ya que se tratan de los AHs más utilizados ^{12,13}. En España, más concretamente en la zona de Castilla y León, nuestro grupo de investigación ha detectado un creciente aumento de los niveles de resistencia frente a los BZs con el paso de los años. Entre los años 2000 y 2010 la RA en esta familia de fármacos se mantuvo en valores estables, encontrándose en el 13% de las explotaciones muestreadas ^{14,15}. Sin embargo, el trabajo desarrollado en el Capítulo I confirma que los niveles de resistencia han aumentado en la zona durante los últimos años, alcanzando un porcentaje de resistencia del 35%. A pesar de ello, son valores considerablemente más bajos que los descritos en otros países de Europa, donde se ha estimado que el porcentaje medio de explotaciones resistentes a los BZs está en torno al 86% ¹³.

Al llevar a cabo el análisis molecular de larvas de *T. circumcincta* resistentes a los BZs, comprobamos que no se detectó ninguno de los tres SNPs de interés que suelen estar presentes de manera habitual en el fragmento específico del gen que codifica el isotipo 1 de la β -tubulina (F167Y, E198A y F200Y). Tras la secuenciación de estas larvas, aisladas de ovejas antes y después del tratamiento con netobimín, se identificó un nuevo polimorfismo en el codón 198 del mismo gen, en donde se encontró una sustitución del ácido glutámico por leucina en el caso de las larvas resistentes. Posteriormente se desarrolló un nuevo ensayo de pirosecuenciación para cuantificar la presencia de este polimorfismo en larvas procedentes de ovejas infectadas de forma natural y la frecuencia se correlacionó con los niveles de resistencia en función del FECRT y el EHT. Los resultados mostraron un nivel de significación muy alto entre las tres técnicas ($r > 0,720$; $p < 0,0001$), por lo que el nuevo ensayo de pirosecuenciación descrito en este Capítulo podría utilizarse de forma rutinaria para la detección de la resistencia cuando la presencia de *T. circumcincta* sea predominante en el rebaño.

A pesar de los intentos de optimizar la eficacia de los fármacos AHs, en los últimos 20 años la RA ha seguido aumentando, convirtiendo el control de los helmintos en un grave problema mundial ¹⁶. Desde 2010 no se han comercializado nuevos

fármacos AHs ¹⁷, por lo que la disponibilidad de nuevas moléculas activas en los próximos años es de urgente necesidad ^{6,18}.

Por lo tanto, los Capítulos II, III y IV de la presente Tesis Doctoral se han enfocado específicamente en la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antihelmíntica. Más concretamente, en el trabajo llevado a cabo en el Capítulo II se cribaron un total de 18 derivados de aminoalcoholes y 16 diaminas previamente sintetizados por el departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca. Se probó la actividad de los compuestos frente a huevos, L₁S y L₃S de una cepa susceptible y otra resistente de *T. circumcincta*. De la misma manera se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad en dos líneas celulares diferentes: adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2, para evaluar la toxicidad en una línea celular de origen intestinal, y el hepatocarcinoma humano HepG2, para evaluar la toxicidad sistémica de los compuestos. Aquellos compuestos con mejor actividad nematocida y menor efecto citotóxico se sometieron a la predicción *in silico* de sus propiedades farmacocinéticas y efectos adversos. Finalmente, los dos compuestos más eficaces y menos tóxicos a nivel celular fueron seleccionados para posteriores experimentos: la diamina AA 30 (denominada como AAD-1 en el trabajo desarrollado en el capítulo III), con potente actividad frente a huevos (DE₅₀= 1,01 μM) y la diamina AA 34 (denominada como AAD-2 en el Capítulo III), como la más potente inhibiendo el movimiento de las L₃S (DE₅₀= 2,67 μM).

Estos resultados, junto con los obtenidos en un estudio llevado a cabo previamente por nuestro grupo de investigación para el cribado de una serie derivados bencimidazólicos, permitió seleccionar un tercer compuesto, el BZ-42, como candidato para desarrollar el trabajo llevado a cabo en el Capítulo III. En este Capítulo, se descartaron los posibles efectos adversos de los tres compuestos tras su administración oral en ratones a una dosis de 250 mg/kg y se evaluó su actividad antihelmíntica utilizando como modelo jerbos de Mongolia infectados con L₃S de *H. contortus*. Decidimos utilizar jerbos infectados con *H. contortus* porque ha demostrado ser un modelo fiable y reproducible para el análisis de la eficacia *in vivo* de compuestos con posible actividad AH ¹⁹⁻²¹ y ha formado parte del proceso de evaluación de la actividad AH de compuestos actualmente comercializados como el monepantel ²² y el

derquantel ²³. Además, el uso de jerbos de Mongolia nos permitió llevar a cabo un primer cribado *in vivo* de los compuestos antes de utilizar el modelo final ovino.

De los tres compuestos probados en jerbos, solamente el derivado de BZ demostró reducir el número de pre-adultos de *H. contortus* presentes en el estómago de los animales de manera significativa (95%), aunque no afectó al número de L₄s. Por esta razón se decidió probar su eficacia utilizando para ello la especie de destino, la oveja. Administrado a una dosis de 120 mg/kg por vía oral, este derivado bencimidazólico produjo una reducción del número de huevos en heces del 99% 7 días después de su administración, y del 95% en el número de adultos presentes en el abomaso de las ovejas. Es por ello que el derivado de BZ podría ser un potencial candidato para el desarrollo de un nuevo fármaco AH eficaz frente a las infecciones provocadas por los NGI. Sin embargo, aún quedan numerosos estudios por realizar, entre los que se incluyen la determinación de la dosis mínima eficaz, así como estudios farmacológicos detallados y en otras especies y cepas de tricostrongídeos. No se deben descartar otros estudios que puedan mejorar la biodisponibilidad del compuesto, con el fin de mejorar la eficacia *in vivo* a dosis más bajas ²⁴. Además, esta nueva molécula podría ser el punto de partida para la síntesis de nuevos compuestos a partir de modificaciones estructurales con el fin de mejorar la eficacia.

La síntesis de nuevos compuestos derivados de fármacos conocidos con un uso aprobado, como en el caso de esta Tesis Doctoral, es una forma razonable de mejorar sus propiedades y eficacia, ya que puede dar lugar a nuevos compuestos con solubilidad y farmacocinética mejoradas ⁶. Sin embargo, el riesgo de desarrollo de resistencia en este caso es aún mayor que en el caso de las estrategias basadas en la síntesis de nuevas entidades moleculares, y por lo tanto debe ser evaluado cuidadosamente ²⁵. A pesar de ello, recientemente se han desarrollado algunos nuevos compuestos prometedores a partir de familias antihelmínticas ya comercializadas, como la tenvermectina ²⁶ perteneciente a la clase de las LMs, o compuestos con nuevos mecanismos de acción, como el derivado imidazólico diisopropilfenil-imidazol ²⁷. También se han hecho progresos con el grupo de los BZs, diseñando una sal de mebendazol, el nitrato de mebendazol, para mejorar su solubilidad en agua ²⁸.

La evaluación de los mismos compuestos en numerosas y diferentes especies de helmintos, representa una estrategia básica a la hora de buscar nuevos tratamientos AHs, ya que, por lo general, gran parte de los compuestos comercializados suelen cubrir un rango amplio de parásitos y no solo de géneros específicos. Además, numerosos fármacos aprobados en veterinaria han sido utilizados en medicina humana y viceversa ^{25,29}. Por estas razones, centrarse en una sola especie no es suficiente ³⁰

Complementariamente, parte de los compuestos (derivados de diaminas, aminoalcoholes y BZs) utilizados en el cribado llevado a cabo en *T. circumcincta* fueron probados en otro parásito que infecta ratones y que es utilizado también como modelo de la infección por NGI en humanos, *T. muris* ³¹. En el trabajo desarrollado dentro del Capítulo IV, dos derivados bencimidazólicos y un derivado de aminoalcohol fueron identificados por su potente actividad frente a L₁s durante un cribado inicial a una dosis de 100 µM. Posteriormente, se probó su eficacia frente a las formas adultas del parásito, que son las que se localizan en el intestino de los animales, a una concentración de 10 µM. Adicionalmente, estos tres candidatos se testaron frente a las formas adultas de otro parásito utilizado como modelo de infecciones causadas por NGI: *H. polygyrus* ³². Al final, dos de los derivados bencimidazólicos, denominados BZ6 y BZ12, mostraron eficacia frente a uno de los dos parásitos utilizados en los ensayos con adultos. El BZ12 presentó una DE₅₀ de 8,1 µM frente a *T. muris* y el BZ6 de 5,3 µM frente a *H. polygyrus*. Además, el BZ6 también había demostrado actividad ovicida en experimentos previos llevados a cabo con *T. circumcincta* ³³, con una DE₅₀ cercana a 15 µM.

Con el objetivo de acelerar el descubrimiento de nuevos fármacos frente a NGI, en el trabajo llevado a cabo en el Capítulo V presentamos un protocolo completo en donde se describe una plataforma de cribado de compuestos de alto rendimiento en L₃s tanto de *H. contortus* como *T. circumcincta*. En este protocolo se determinó la motilidad de los parásitos utilizando el equipo wMicrotracker ONE, capaz de medir la interferencia de un haz de luz infrarroja por el movimiento de los parásitos y registrar "recuentos de actividad" como medida de la motilidad. El trabajo describe el proceso completo desde la obtención de L₃s a partir de las heces de corderos infectados

mediante la técnica del coprocultivo, el desenvainado de las larvas y el cribado. Este sistema se ha aplicado en algunas ocasiones para llevar a cabo cribados de compuestos en *C. elegans*³⁴⁻³⁶, pero también en diferentes NGI como *H. contortus*, *T. circumcincta* y *C. oncophora*^{37,38}. Sin embargo, nosotros llevamos a cabo una serie de adaptaciones en los protocolos hasta ahora descritos con el fin de mejorar el rendimiento de la técnica a nuestra conveniencia. La utilización de placas de 96 pocillos con fondo en forma de “U” nos permitió utilizar un número más bajo de larvas por pocillo, en contraste con trabajos de otros autores³⁷⁻³⁹, así como el uso de agua del grifo tras el desenvainado como medio de mantenimiento de las L₃s, en vez de medios de cultivo estériles, como medio LB o RPMI 1640, utilizado por la mayor parte de los autores³⁷⁻³⁹. El hecho de no llevar a cabo todo el proceso bajo condiciones de esterilidad nos permite acortar el tiempo de desarrollo de la técnica. Una de las principales ventajas de este sistema con respecto al cribado automatizado que utiliza instrumentos de microscopía de alta resolución combinada con la captura y el análisis de imágenes^{40,41} es el coste significativamente menor de la instrumentación. Además, el wMicroTracker puede lograr rendimientos de 5.000 a 10.000 compuestos por semana, según se utilicen placas de 96 o 384 pocillos⁴² y permite el cribado de compuestos de una manera más objetiva que los métodos convencionales hasta ahora utilizados, como el EHT, LMT o LMIT^{22,43}.

En conjunto, la presente Tesis Doctoral se ha centrado en la búsqueda de nuevos posibles compuestos con actividad antihelmíntica contra tricostrongídeos, así como frente a otros nematodos parásitos de importancia socioeconómica, para su posterior desarrollo. Para ello, hemos seguido varios enfoques distintos: uno centrado en el cribado de compuestos tanto *in vitro* como *in vivo*; y otro enfocado en el desarrollo y perfeccionamiento de técnicas de cribado de mayor rendimiento.

Al comparar los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral con los obtenidos por otros autores en trabajos de descubrimiento de fármacos AHs, se puede concluir que algunos de los candidatos identificados en ellos presentaron valores de DE₅₀ comparables a los obtenidos en nuestro estudio. Por ejemplo, los inhibidores de quinasa, SNS-032 y AG-1295, identificados por Jiao *et al.*⁴⁴, mostraron unos valores DE₅₀ de 12,4 y 9,92 μ M, respectivamente, inhibiendo la motilidad de las L₃s de *H.*

contortus, en comparación con la DE₅₀ obtenida por el compuesto AA-34 en el LMIT llevado a cabo en *T. circumcincta* en el Capítulo II, que fue de 2.67 µM. En el caso de la amida de bifenilo y el análogo del pirazolo[1,5-a]piridina identificados por Preston *et al.* ⁴³, las DE₅₀ obtenidas para inhibir la motilidad de L₃s de *H. contortus* se situaron entre 14 y 47 µM.

En cribados de alto rendimiento también se ha identificado un insecticida organofosforado, el triclorfón ⁴⁵, cuya actividad fue evaluada en ovejas infectadas con *H. contortus* a una dosis muy similar (100 mg/kg) a la utilizada en nuestro estudio (120 mg/kg) llevado a cabo en el Capítulo III. Su administración dio lugar a una reducción del número de huevos en heces del 99%, la misma que la obtenida en nuestro estudio por el derivado bencimidazólico.

Por otro lado, el candidato identificado como OX02983 y algunos de sus análogos, pertenecientes al grupo de las dihidrobenzoxazepinonas, mostraron DE₅₀s inhibiendo la motilidad de adultos de *T. muris* de en torno a 25-50 µM ⁴⁶, bastante mayores en comparación a los valores obtenidos en el Capítulo IV de nuestro trabajo por el BZ12, que presentó un valor de 8,1 µM.

En nuestra opinión, algunos de estos compuestos podrían representar puntos de partida para el desarrollo de posibles candidatos. En consecuencia, los próximos pasos de la investigación que se deberían llevar a cabo incluyen: la optimización química de los productos químicos representativos descubiertos en los Capítulos III y IV, mediante evaluaciones de la relación estructura-actividad; la evaluación de la amplitud del espectro de actividad antihelmíntica sobre otra serie de nematodos parásitos; la investigación detallada del ADMET; ensayos para establecer la dosificación, biodisponibilidad, índice terapéutico, seguridad, formulación; y el establecimiento de los modos de acción de los candidatos principales.

En resumen, es importante seguir investigando en esta área, no sólo para revelar nuevas posibilidades para el tratamiento de las helmintiasis, sino también para obtener nueva información que amplíe los conocimientos actuales en helmintología, farmacología, etc. No obstante, todos los AHs utilizados en la terapia humana se desarrollaron inicialmente para el tratamiento del ganado y, por tanto, los avances en

el tratamiento de las helmintiasis veterinarias podrían mejorar también la terapia humana ⁶.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fitzpatrick, J. L. Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists. *Vet. Parasitol.* **195**, 233–248 (2013).
2. Charlier, J. et al. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Prev. Vet. Med.* **182**, 105103 (2020).
3. Roeber, F., Jex, A. R. & Gasser, R. B. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites Vectors.* **6**, 153 (2013).
4. Stear, M. J., Doligalska, M. & Donskow-Schmelter, K. Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology.* **134**, 139–151 (2007).
5. Zajac, A. M. & Garza, J. Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* **36**, 73–87 (2020).
6. Zajíčková, M., Nguyen, L. T., Skálová, L., Raisová Stuchlíková, L. & Matoušková, P. Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. *Drug Discov. Today.* **25**, 430–437 (2020).
7. Shalaby, H. A. Anthelmintics Resistance; How to overcome it? *Iran. J. Parasitol.* **8**, 18-32 (2013).
8. Kotze, A. C. & Prichard, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv. Parasitol.* **93**, 397–428 (2016).
9. Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G. & Sangster, N. C. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* **20**, 469–476 (2004).
10. Kaplan, R. M. & Vidyashankar, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* **186**, 70–78 (2012).
11. Tariq, K. A. A Review of the Epidemiology and Control of Gastrointestinal Nematode Infections of Small Ruminants. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* **85**, 693–703 (2015).
12. Papadopoulos, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rumin. Res.* **76**, 99–103 (2008).
13. Vineer, H. R. et al. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: Creation and meta-analysis of an open database. *Parasite.* **27**, 69 (2020).
14. Álvarez-Sánchez, M. A., Pérez-García, J., Cruz-Rojo, M. A. & Rojo-Vázquez, F. A. Anthelmintic resistance in trichostrongylid nematodes of sheep farms in Northwest Spain. *Parasitol. Res.* **99**, 78–83 (2006).
15. Martínez-Valladares, M. et al. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by *in vivo* and *in vitro* techniques. *Vet. Parasitol.* **191**, 177–181 (2013).
16. Lanusse, C. et al. Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants. *Trends Parasitol.* **34**, 664–682 (2018).
17. Little, P. R., Hodge, A., Maeder, S. J., Watson, T. G. & Seed, J. A. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* **58**, 121–129 (2010).

18. Geary, T. G., Sakanari, J. A. & Caffrey, C. R. Anthelmintic drug discovery: Into the future. *J. Parasitol.* **101**, 125–133 (2015).
19. Conder, G. A. et al. A Novel Anthelmintic Model Utilizing Jirds, *Meriones unguiculatus*, infected with *Haemonchus contortus*. *Source J. Parasitol.* **76**, 168–170 (1990).
20. Conder, G. A. et al. Growth and Development of *Haemonchus contortus* in Jirds, *Meriones unguiculatus*. *J. Parasitol.* **78**, 492–497 (1992).
21. Geary, T. G. *Haemonchus contortus*: Applications in Drug Discovery. *Adv. Parasitol.* **93**, 429–463 (2016).
22. Kaminsky, R. et al. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol. Res.* **103**, 931–939 (2008).
23. Woods, D. J. et al. Discovery, Mode of Action, and Commercialization of Derquantel. In *Parasit. Helminths Targets, Screens, Drugs Vaccines*. 297–307 (2012).
24. Fernández, L., Sigal, L., Otero, L., Silber, J. J. & Santo, M. Solubility improvement of an anthelmintic benzimidazole carbamate by association with dendrimer. *Brazilian J. Chem. Eng.* **28**, 679–689 (2011).
25. Panic, G., Duthaler, U., Speich, B. & Keiser, J. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. *Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist.* **4**, 185–200 (2014).
26. Fei, C. et al. Safety and clinical efficacy of tenvermectin, a novel antiparasitic 16-membered macrocyclic lactone antibiotics. *Eur. J. Pharm. Sci.* **117**, 154–160 (2018).
27. Blanco, M. G. et al. Diisopropylphenyl-imidazole (DII): A new compound that exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 12 (2018).
28. Gutiérrez, E. L., Souza, M. S., Diniz, L. F. & Ellena, J. Synthesis, characterization and solubility of a new anthelmintic salt: Mebendazole nitrate. *J. Mol. Struct.* **1161**, 113–121 (2018).
29. Keiser, J. et al. Evaluation of an FDA approved library against laboratory models of human intestinal nematode infections. *Parasites and Vectors.* **9**, 1–10 (2016).
30. Hahnel, S. R., Dilks, C. M., Heisler, I., Andersen, E. C. & Kulke, D. *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research – Old model, new perspectives. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **14**, 237–248 (2020).
31. Klementowicz, J. E., Travis, M. A. & Grecis, R. K. *Trichuris muris*: A model of gastrointestinal parasite infection. *Semin. Immunopathol.* **34**, 815–828 (2012).
32. Monroy, F. G. & Enriquez, F. J. *Heligmosomoides polygyrus*: A model for chronic gastrointestinal helminthiasis. *Parasitol. Today.* **8**, 49–54 (1992).
33. Escala, N. et al. Synthesis, bioevaluation and docking studies of some 2-phenyl-1H-benzimidazole derivatives as anthelmintic agents against the nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Eur. J. Med. Chem.* **208**, 112554 (2020).
34. Risi, G. et al. *Caenorhabditis elegans* Infrared-Based Motility Assay Identified New Hits for Nematicide Drug Development. *Vet. Sci.* **6**, 29(2019).
35. Hahnel, S. R., Roberts, W. M., Heisler, I., Kulke, D. & Weeks, J. C. Comparison of electrophysiological and motility assays to study anthelmintic effects in *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **16**, 174–187 (2021).

36. Vairoletti, F., Baron, A., Saiz, C., Mahler, G. & Salinas, G. Increased sensitivity of an infrared motility assay for nematicide discovery. *MicroPubl. Biol.* 10.17912/micropub.biology.000500.(2021).
37. Liu, M., Landuyt, B., Klaassen, H., Geldhof, P. & Luyten, W. Screening of a drug repurposing library with a nematode motility assay identifies promising anthelmintic hits against *Cooperia oncophora* and other ruminant parasites. *Vet. Parasitol.* **265**, 15–18 (2019).
38. Taki, A. C. et al. High-Throughput Phenotypic Assay to Screen for Anthelmintic Activity on *Haemonchus contortus*. *Pharm.* **14**, 616(2021).
39. Shanley, H. T. et al. A High-Throughput Phenotypic Screen of the ‘Pandemic Response Box’ Identifies a Quinoline Derivative with Significant Anthelmintic Activity. *Pharm.* **15**, 257 (2022).
40. Aulner, N., Danckaert, A., Ihm, J. E., Shum, D. & Shorte, S. L. Next-Generation Phenotypic Screening in Early Drug Discovery for Infectious Diseases. *Trends Parasitol.* **35**, 559–570 (2019).
41. Chen, S. et al. A multi-dimensional, time-lapse, high content screening platform applied to schistosomiasis drug discovery. *Commun. Biol.* **31**, 1–9 (2020).
42. Taki, A. C., Byrne, J. J., Boag, P. R., Jabbar, A. & Gasser, R. B. Practical High-Throughput Method to Screen Compounds for Anthelmintic Activity against *Caenorhabditis elegans*. *Molecules.* **26**, 4156 (2021).
43. Preston, S. et al. Low cost whole-organism screening of compounds for anthelmintic activity. *Int. J. Parasitol.* **45**, 333–343 (2015).
44. Jiao, Y. et al. Screening of the ‘Stasis Box’ identifies two kinase inhibitors under pharmaceutical development with activity against *Haemonchus contortus*. *Parasites and Vectors.* **10**, 1–7 (2017).
45. Robson Duarte, E. et al. Anthelmintic efficacy of trichlorfon and blood parameters of young lambs infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **272**, 40–43 (2019).
46. Partridge, F. A. et al. Dihydrobenz[e][1,4]oxazepin-2(3H)-ones, a new anthelmintic chemotype immobilising whipworm and reducing infectivity in vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, (2017).

CONCLUSIONS

The conclusions obtained in each study carried out during the Doctoral Thesis are presented below:

1.- “*Teladorsagia circumcincta* beta tubulin: the presence of the E198L polymorphism on its own is associated with benzimidazole resistance”.

The percentage of flocks with BZ resistance in the area of study (provinces of Castilla and Leon community) was 35% by FECRT or 26% by EHT.

A mutation of glutamic acid (GAA) to leucine (CTA) at codon 198 (E198L) of the isotype-1 β -tubulin gene, confers BZ resistance on its own in *T. circumcincta*. The leucine frequency ranged between 10.4 and 80.7% before treatment, and from 82.3 to 92.8% after treatment.

High and similar correlations were reported between the leucine frequency and phenotypic resistance ($r > 0.720$; $p < 0.0001$), although negatively associated with the FECRT and positively with the EHT.

2.- “Anthelmintic activity of aminoalcohol and diamine derivatives against the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*”

Compound AA 30 showed the highest AH activity, with an ED_{50} value of $1.01 \pm 0.04 \mu\text{M}$ in the EHT, and also very interesting values against larvae, both in the LMT ($5.62 \pm 0.06 \mu\text{M}$) and in the LMIT ($4.88 \pm 0.25 \mu\text{M}$), reaching the highest SI of all compounds in Caco-2 cells (21.21 in EHT).

Despite AA 34 only showed activity against L_3 , it could be considered for further studies since it showed the lowest ED_{50} in the LMIT, both in the susceptible ($2.67 \pm 0.08 \mu\text{M}$) and resistant ($3.02 \pm 0.09 \mu\text{M}$) isolate.

3.- “Novel compound shows *in vivo* anthelmintic activity in gerbils and sheep infected by *Haemonchus contortus*”

BZ-42 was able reduce the 99% of eggs and 95% of adult worms in sheep at an oral dose of 120 mg/kg. Therefore this compound could be a potential candidate for the treatment of *H. contortus*, - and probably other GIN infections - in ruminants, or as a starting point for the synthesis of further structurally related compounds.

4.- “Benzimidazole and aminoalcohol derivatives show *in vitro* anthelmintic activity against *Trichuris muris* and *Heligmosomoides polygyrus*”

Two compounds, BZ6 and BZ12, were identified as “hits” since BZ6 showed an ED₅₀ of 8.1 μM on *T. muris* adults and BZ12 showed and ED₅₀ of 5.3 μM on *H. polygyrus* adults. Both compounds should be taken into consideration for future studies that should include the evaluation of their ADMET, as well as *in vivo* efficacy and safety experiments with animals.

5.- “Screening for compounds with anthelmintic activity in *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta* using motility measurement”

Motility measurement by wMicroTracker is an easy-to-use method for screening compounds with anthelmintic activity that allows the processing of medium sized chemical libraries in a single week.

After the protocol implementation, stimulation of worms’ movement by repeated pipette aspiration before the measurement proved to be a crucial point for successful readings, as well as the use of U-bottom microtiter plates, which allowed the use of a lower number of larvae per well compared to other studies: 30 and 50 L₃ for *T. circumcincta* and *H. contortus*, respectively.

ANEXO I.


Publicaciones científicas

RESEARCH

Open Access



Teladorsagia circumcincta beta tubulin: the presence of the E198L polymorphism on its own is associated with benzimidazole resistance

María Martínez-Valladares^{1,2*} , Elora Valderas-García^{1,3}, Javier Gandasegui⁴, Philip Skuce⁵, Alison Morrison⁵, Verónica Castilla Gómez de Agüero^{1,2}, Maria Cambra-Pellejà^{1,2}, Rafael Balaña-Fouce³ and Francisco A. Rojo-Vázquez²

Abstract

Background: Benzimidazole resistance is associated with isotype-1 β -tubulin gene F200Y, E198A and F167Y SNPs. In this study, the recently described polymorphism E198L was reported and analysed in *Teladorsagia circumcincta*.

Methods: The benzimidazole phenotypic resistance was measured by the faecal egg count reduction test (FECRT) and the egg hatch test (EHT) using a discriminating dose (DD) in 39 sheep flocks. Around 1000 larvae collected before and after treatment were used for DNA extraction. The resistant species identified in all flocks was *T. circumcincta*. The resistance alleles frequencies were measured for F200Y and E198A. A 371-bp fragment of the isotype-1 β -tubulin gene was analysed, including the three codons of interest, and a new pyrosequencing assay was designed for testing E198L.

Results: The percentage of resistant flocks was 35% by FECRT or 26% by EHT; however, F200Y and E198A SNPs were absent in *T. circumcincta*. The amplification of a 371-bp fragment confirmed the absence of F167Y and F200Y in 6 resistant flocks. Regarding codon 198, all samples after treatment carried a leucine (CTA). A pyrosequencing assay analysed the allele frequencies for the first two bases at codon 198 independently, G/C and A/T. The correlation between C and T frequencies was almost 1 ($r = 0.929$, $P < 0.0001$) and the mean value of both was calculated to measure the leucine frequency; this value ranged between 10.4–80.7% before treatment, and 82.3–92.8% after treatment. High and similar correlations were reported between the genotypic variables (C frequency, T frequency or mean of both frequencies) and phenotypic resistance ($r > 0.720$, $P < 0.0001$), although negatively associated with the FECRT and positively with the EHT. According to multivariate linear regression analysis, the T frequency was the most significant variable influencing the phenotypic resistance (FECRT or EHT; $P < 0.0001$). In the EHT, 67.1% of the phenotypic variability is associated with the T frequency but in the FECRT only 33.4%; therefore, the EHT using a DD seems to detect the genotypic resistance more accurately than the FECRT.

Conclusions: The E198L polymorphism can confer BZ resistance on its own in *T. circumcincta*.

Keywords: Benzimidazole resistance, *Teladorsagia circumcincta*, FECRT, EHT, β -tubulin gene, Polymorphism

*Correspondence: mmarva@unileon.es

¹ Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León),

Grulleros, 24346 León, Spain

Full list of author information is available at the end of the article





Anthelmintic activity of aminoalcohol and diamine derivatives against the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*

Elora Valderas-García^{a,d,1}, Jennifer de la Vega^{c,1}, María Álvarez Bardón^d,
Verónica Castilla Gómez de Agüero^{a,b}, Ricardo Escarcena^c, José Luis López-Pérez^{c,e},
Francisco A. Rojo-Vázquez^b, Arturo San Feliciano^{c,f}, Esther del Olmo^{c,*}, Rafael Balaña-
Fouce^{d,*}, María Martínez-Valladares^{a,b,**}

^a Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, 24346, Grulleros, León, Spain

^b Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071, León, Spain

^c Departamento de Ciencias Farmacéuticas: Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, CIETUS, IBSAL, 37007, Salamanca, Spain

^d Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071, León, Spain

^e Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Panamá, R. de Panamá

^f Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajaí, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Teladorsagia circumcincta

Anthelmintic

Aminoalcohol

Diamine

In vitro assays

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes (GIN) infections are a serious problem in livestock production due to the great economic losses they cause. Their control is increasingly difficult because of the rapid development of drug resistance and the limited number of available drugs. Therefore, this study evaluated 18 aminoalcohol and 16 diamine derivatives against eggs, first and third stage larvae from a susceptible and a resistant isolate of *Teladorsagia circumcincta* collected from sheep. The effectiveness of the *in vitro* anthelmintic activity of the compounds was evaluated using three different procedures: Egg Hatch Test (EHT), Larval Mortality Test (LMT) and Larval Migration Inhibition Test (LMIT). Those compounds with activities higher than 90 % in the initial screening at 50 μM were selected to determine their half maximal effective concentration (EC_{50}). In parallel, cytotoxicity assays were conducted on Caco2 and HepG2 cell lines to calculate Selectivity Indexes (SI) for each compound. The diamine **30** presented the best results in preventing egg hatching, displaying the lowest EC_{50} value ($1.01 \pm 0.04 \mu\text{M}$) of all compounds tested and the highest SI (21.21 vs. Caco-2 cells). For the LMIT, the diamine **34** showed the highest efficacy, with EC_{50} values of 2.67 ± 0.08 and $3.02 \pm 0.09 \mu\text{M}$ on the susceptible and resistant isolate of the parasite, respectively.

1. Introduction

Helminth infection caused by gastrointestinal nematodes (GIN) is a major health problem in ruminants leading to significant economic losses in grazing livestock, especially sheep, as the infection results in retarded growth, lower milk production, poor wool quality, impaired fertility and even death when the worm burden is very high (Craig, 2018; Zajac and Garza, 2020).

One of the strategies for the control of GIN infections has been based on the systematic administration of anthelmintic drugs as a part of integrated strategies. However, over the years the injudicious use of these

drugs has led to the selection and spread of resistant GINs, especially to the two classes of broad-spectrum anthelmintics most commonly used: benzimidazoles (BZs) such as albendazole and fenbendazole, and macrocyclic lactones (MLs) such as ivermectin (Jackson and Coop, 2000; Kaplan, 2004; Papadopoulos et al., 2012). Unfortunately, this phenomenon is disseminated throughout the world (Kaplan and Vidyashankar, 2012), including Europe, where numerous cases of anthelmintic resistance (AR) have been reported in the last decades (O'Connor et al., 2006; Martínez-Valladares et al., 2012, 2015; Morgan and van Dijk, 2012; Papadopoulos et al., 2012; Traversa and von Samson-Himmelstjerna, 2016). In the last two decades, few drugs have

* Corresponding author.

** Corresponding author at: Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, 24346, Grulleros, León, Spain.

E-mail addresses: olmo@usal.es (E. del Olmo), rbalf@unileon.es (R. Balaña-Fouce), mmarva@unileon.es (M. Martínez-Valladares).

¹ These authors contributed equally.