

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

Nombre: Valderas García, Elora

Universidad: Universidad de León

Departamento: Ciencias biomédicas

Fecha de lectura: 10/06/2022

Mención a doctor europeo: concedido

Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias y de los Alimentos por la Universidad de León

Dirección:

> **Director:** FRANCISCO ANTONIO ROJO VAZQUEZ

> **Director:** RAFAEL BALAÑA FOUCE

> **Director:** MARÍA MARTÍNEZ VALLADARES

Tribunal:

> **presidente:** Adolfo Paz Silva

> **secretario:** CARLOS GARCÍA ESTRADA

> **vocal:** Luis Ignacio Alvarez

Descriptores:

> PARASITOLOGIA ANIMAL

> CIENCIAS VETERINARIAS

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

Localización: BIBLIOTECA UNVIERSITARIA DE SAN ISIDORO

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 tricostrongilidos 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 (DE50) 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 DE50 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 DE50 8,1 μM frente a *T. muris* y el otro una DE50 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 tricostrongídeos 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 ($r > 0,720$; $p < 0,0001$).