

**Facultad de Ciencias
Universidad de la República**

**BÚSQUEDA DE DROGAS Y BLANCOS
DE DROGAS NEMATICIDAS USANDO
*C. ELEGANS***

Tesis de Maestría en Biotecnología

Ing. Gastón Risi

**Director de Tesis: Dr. Gustavo Salinas
*Laboratorio de Biología de Gusanos
Institut Pasteur de Montevideo - UdelaR*
2018**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutor, Gustavo Salinas, por la gran orientación, el soporte y la discusión crítica que me permitieron aprovechar al máximo el trabajo y que esta tesis llegara a buen término.

Por otro lado, quiero agradecer a todo el equipo del laboratorio por apoyarme y contribuir al proyecto desde el primer momento. Agradezco especialmente a Inés Carrera, Lucía Otero, Jorge Pórfido, Laura Romanelli, Cecilia Martínez y Enrique Ladós.

También quiero agradecer a mi familia y amigos por el apoyo incondicional, el aguante y la confianza. Porque siempre creyeron en mí y me apoyaron en situaciones de cansancio y estrés.

Por otra parte quiero agradecer a la ANII por el apoyo brindado por medio de la beca de maestría y la beca de movilidad. Agradezco también a los integrantes del tribunal por aceptar evaluar este trabajo.

Por último pero no menos importante, a todos aquellos que no he nombrado pero que saben que ayudaron a que este proyecto se hiciera realidad.

¡Muchas gracias!

RESUMEN

Las infecciones parasitarias causadas por helmintos son un gran problema sanitario de escala mundial. Los helmintos son parásitos eucariotas multicelulares pertenecientes a los filos *Nematoda* (gusanos redondos) y *Platyhelminthes* (gusanos planos). Se estima que infectan a más de un 25% de la población mundial. Además, afectan en gran medida a la ganadería, causando pérdida de peso, aumento en la mortalidad y un marcado descenso en la producción. Su impacto económico es tan grande que generan un mercado de antihelmínticos para uso veterinario de 11 mil millones de dólares anuales, frente a los 500 millones de dólares anuales del mercado de antihelmínticos para uso humano. El control de nematodos que afectan al ganado es llevado a cabo, principalmente, con la aplicación de fármacos. Una de las principales dificultades que se presenta con su uso es la aparición y diseminación de resistencia a los nematicidas. Se ha encontrado resistencia a todos los grupos químicos más utilizados, siendo además esta resistencia alta y en aumento.

Surge por lo tanto la necesidad de desarrollar nuevas drogas nematicidas efectivas. La identificación de nuevos blancos o moléculas activas suele ser uno de los mayores obstáculos en el desarrollo de nuevas drogas. Además, realizar *screenings* con los nematodos parásitos suele ser caro, complejo e incluso puede enfrentar problemas éticos. Sin embargo, el uso del nematodo modelo *C. elegans*, de vida libre, resulta beneficioso para estas aproximaciones. El objetivo general de este trabajo es la búsqueda y descubrimiento de drogas y blancos nematicidas utilizando el organismo modelo *C. elegans*. Para esto se realizaron diferentes cribados con ensayos fenotípicos de motilidad y de excavación, para la búsqueda de drogas y blancos respectivamente.

Para validar el método se evaluó la biblioteca química "Pathogen Box" identificándose al tolfenpyrad como única molécula nematicida; resultado idéntico al obtenido por un grupo australiano usando el nematodo parásito *Haemonchus contortus*. Se procedió luego evaluando bibliotecas tanto de productos químicos sintéticos como de productos naturales. Fue posible la identificación de positivos mediante ambas aproximaciones. El *screening* de la biblioteca de productos químicos permitió identificar ariliden cetonas y aril hidracinas como nuevos nematicidas. Además, uno de estos compuestos, (1E,2E)-1,2-bis(tiofen-3-ilmetil)hidracina, presentó actividad nematicida total a 25 μM , siendo inocuo frente al vertebrado modelo zebrafish a 50 μM . Por otra parte, el *screening* de 10.240 extractos naturales proveniente de biota de plantas e invertebrados marinos (Nature Bank) permitió identificar varios extractos nematicidas provenientes de esponjas. Finalmente, para la búsqueda de nuevos blancos con potencial nematicida, se interfirió la expresión de 768 genes de *C. elegans* presentes en nematodos y ausentes en vertebrados, evaluándose luego la capacidad de excavación del gusano. Se obtuvieron 59 potenciales blancos a ser estudiados.

Palabras Clave: nematodo, *C. elegans*, nematicida, *drug discovery*.

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen	4
Índice	6
1. Introducción	8
1.1 Problema de la helmintiasis	8
1.2 Nematicidas	10
1.2.1 Benzimidazoles	13
1.2.1 Levamisol, pirantel y morantel	13
1.2.1 Avermectinas y milbemicinas	14
1.3 Problemas de trabajar con nematodos parásitos	15
1.4 <i>C. elegans</i> como organismo modelo	15
1.5 <i>C. elegans</i> como “parásito” modelo.....	19
1.6 <i>C. elegans</i> como modelo para la investigación en nematicidas.....	22
1.7 <i>Drug Discovery</i>	23
1.7.1 Target-based drug discovery	24
1.7.2 Phenotypic-based drug discovery.....	27
1.8 Librerías de compuestos para cribado	29
1.8.1 Productos naturales.....	30
1.8.2 Librerías de compuestos químicos sintéticos	33
1.9 Definición de la propuesta	35
1.9.1 Búsqueda de drogas nematicidas	35
1.9.2 Búsqueda de blancos nematicidas.....	37
2. Objetivos.....	38
2.1 Objetivo General	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3. Metodología.....	39
3.1 Materiales	39
3.2 Métodos	39

3.2.1 Obtención de las muestras de Nature Bank	39
3.2.2 Mantenimiento de <i>C. elegans</i>	40
3.2.3 Ensayo de motilidad de <i>C. elegans</i>	40
3.2.4 Ensayo de <i>Haemonchus</i> spp.	41
3.2.5 Ensayo de toxicidad en zebrafish.....	41
3.2.6 Identificación de genes de nematodos a interferir.....	41
3.2.7 Ensayo de interferencia génica en <i>C. elegans</i>	42
4. Resultados y Discusión. Parte 1: Búsqueda de nuevos compuestos nematocidas de librerías de productos químicos sintéticos	44
5. Resultados y Discusión. Parte 2: Búsqueda de nuevos compuestos nematocidas de extractos de productos naturales	98
6. Resultados y Discusión. Parte 3: Búsqueda de nuevos blancos nematocidas	110
7. Discusión general y perspectivas.....	113
8. Referencias Bibliográficas.....	115
9. Anexo	126

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problema de la helmintiasis

Las infecciones parasitarias son un gran problema de la salud de escala mundial; especialmente en países en vías de desarrollo donde su mortalidad es incluso superior a la de otros agentes infecciosos¹. Históricamente, el término parásito se ha utilizado para clasificar a dos grandes y heterogéneos grupos de organismos: (a) los protozoarios, los cuales son organismos eucariotas unicelulares y (b) los helmintos, los cuales son organismos eucariotas multicelulares pertenecientes al reino animal conformados por los filos *Nematoda* (gusanos redondos) y *Platyhelminthes* (gusanos planos, de las clases céstodos y tremátodos). Los protozoarios son responsables de la mayor parte de la mortalidad atribuida a infecciones parasitarias mientras que los helmintos suelen provocar morbilidad, debido a enfermedades crónicas, debilitantes a largo plazo. Es por esto que la sociedad en general tiene más conocimiento de las infecciones parasitarias causadas por protozoarios (como la malaria) que de aquellas causadas por helmintos¹. Sin embargo, se estima que sólo los helmintos gastrointestinales infectan a más de un 25% de la población mundial, es decir, unas 2.000 millones de personas. Además, a pesar de la aplicación de técnicas médicas modernas, la proporción de la población infectada por estos no se está viendo reducida^{2,3}.

Por otro lado, las infecciones generadas por helmintos afectan en gran medida a la ganadería, causando un aumento en la mortalidad, pérdida de peso y un marcado descenso en la producción. Su impacto económico es tan grande que genera un mercado de antihelmínticos para uso veterinario de 11 mil millones de dólares anuales, frente a los 500 millones de dólares anuales del mercado de los antihelmínticos para uso humano^{4,5}. Por otra parte, los gusanos parásitos también son capaces de afectar los cultivos, reduciendo la producción vegetal hasta en un 14,6% lo que se traduce en pérdidas estimadas en 118 mil millones de dólares anuales mundialmente⁶.

Las estrategias actuales para hacer frente a esta problemática en el área veterinaria productiva pueden dividirse en dos grupos:

- Métodos químicos de control:

Uso de productos químicos (antihelmínticos o nematicidas), que a las dosis utilizadas, ejercen su efecto letal sobre las formas parasitarias y no afecte al hospedador al cual ha sido destinado.

- Métodos no químicos de control:
 1. Manejo antiparasitario a través de la obtención y el uso de pasturas seguras o limpias.
 2. Control Genético mediante la selección de aquellos animales más resistentes a las parasitosis por gusanos.
 3. Control Inmunitario: aplicación de vacunas, enfocadas a obtener un mayor estímulo y desarrollo de la respuesta inmune, para lograr frenar el establecimiento y mantenimiento de poblaciones parásitas por parte del animal.
 4. Control Biológico: uso de organismos vivos, principalmente hongos nematófagos como *Duddingtonia flagrans*, para controlar, fundamentalmente, los estadios de vida libre de los gusanos⁷.

En la práctica, casi todo el control de nematodos internos es llevado a cabo con la aplicación de tratamientos químicos, utilizando distintos fármacos disponibles comercialmente en el mercado veterinario. Una de las principales dificultades que se presenta con su uso es la aparición y diseminación de resistencia a los antihelmínticos (Tabla 1). La misma se acentúa en el uso veterinario por el bajo nivel de control y su administración masiva⁸⁻¹⁰. Los fármacos utilizados son de venta libre al público en general, sin el requerimiento de una prescripción veterinaria previa.

Tabla 1: Aparición de resistencia a diferentes grupos químicos a nivel mundial. Para cada droga habilitada para su comercialización la resistencia es detectada a corto o mediano plazo.

Fármaco	Hospedero	Aprobación de la droga	Reporte de resistencia
Benzimidazoles			
Tiabendazol	Oveja	1961	1964 ^{11,12}
	Caballo	1962	1965 ⁵
Imidotiazoles – tetrahidropirimidinas			
Levamisol	Oveja	1970	1979 ¹³
Pirantel	Caballo	1974	1996 ¹⁴
Avermectinas – milbemicinas			

Ivermectina	Oveja	1981	1988 ¹⁵
	Caballo	1983	2002 ¹⁶
Moxidectin	Oveja	1991	1995 ^{17,18}
	Caballo	1995	2003 ⁵

En Uruguay existen cifras alarmantes de resistencia (Tabla 2). Se ha encontrado resistencia a todos los grupos químicos más utilizados como antihelmínticos, siendo además esta resistencia alta y en aumento¹⁹⁻²¹. Es interesante notar como existen casos de resistencia ya descritos para drogas tan nuevas como el monepantel, a menos de cumplirse 2 años de sus primeras aplicaciones²². Por lo tanto, es de suma importancia identificar nuevos blancos farmacológicos que permitan descubrir nuevas drogas.

Tabla 2: Resistencia a los diferentes grupos químicos a lo largo del tiempo en predios ovinos uruguayos. Abreviaturas: BZ: Benzimidazoles, LMZ: Levamisol, IVM: Ivermectinas, MXD: Moxidectin, CLT: Closantel, MON: Monepantel.

Año	Nº de Predios	% de Predios con Resistencia					
		Grupo BZ	Grupo LVM	Grupo IVM	Grupo MXD	Grupo CLT	Grupo MON
1994/95 ¹⁹	252	86	71	1,2	-	-	-
1999/2001 ²⁰	23	91	65	65	0	62,5	-
2002/03 ²⁰	82	96	80	85	26	90	-
2005 ²¹	130	98	82	89	29	89	-
2014 ²¹	36	100	91,2	-	94,4	93,1	6,1

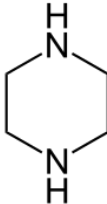
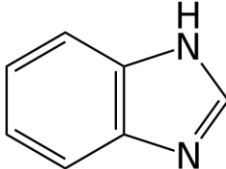
En relación a los antihelmínticos es importante señalar que algunos son de amplio espectro, siendo efectivos tanto para nematodos como para platelmintos, en tanto otros son de espectro más reducido, siendo efectivo contra uno de los dos grandes grupos de helmintos, o incluso subgrupos dentro de éstos. Dado que el centro de la presente tesis es la búsqueda de nematicidas, nos centraremos fundamentalmente en este grupo de antihelmínticos.

1.2 Nematicidas

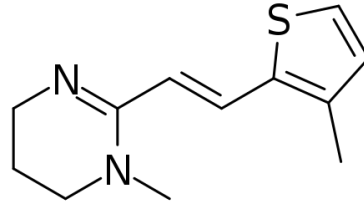
Los nematocidas son drogas utilizadas para tratar infecciones por gusanos redondos, es decir, nematodos. Dichas drogas son de gran importancia para la salud humana y veterinaria. Sin embargo, más allá de la alta prevalencia de los gusanos parásitos, el descubrimiento de drogas nematocidas no es una de las prioridades de las empresas farmacéuticas. La principal razón radica en que los países que más sufren sus consecuencias poseen economías vulnerables y no invierten en programas de descubrimiento de drogas o terapias. Entonces, no es sorpresa que la mayoría de las drogas utilizadas en humanos hayan sido originalmente desarrolladas para uso veterinario²³.

De esta forma, existe un pequeño repertorio de agentes terapéuticos disponibles para el tratamiento (Tabla 3). Curiosamente, el problema fue exacerbado por el gran éxito de la ivermectina en las últimas décadas. El mismo fue tan grande que provocó un descenso en la motivación de llevar a cabo nuevos programas de descubrimiento de drogas. Lamentablemente, la aparición de resistencia a la ivermectina en animales de producción evidenció la ausencia de drogas sustitutas. Actualmente existe temor de que sólo sea cuestión de tiempo hasta que el fenómeno de la resistencia también se disemine en parásitos humanos^{23,24}.

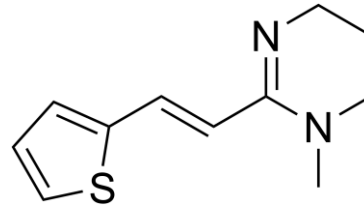
Tabla 3: Principales drogas registradas para el tratamiento de infecciones de nematodos parásitos en humanos²⁵.

Droga	Estructura general
Piperazina	
Benzimidazoles	

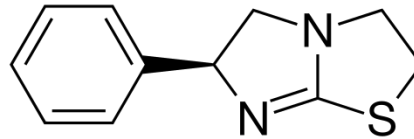
Morantel



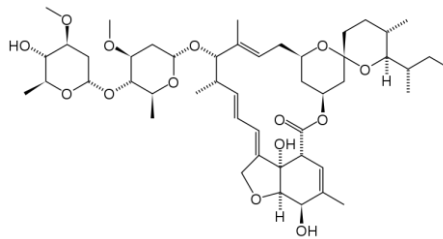
Pirantel



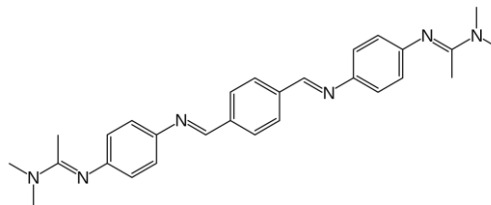
Levamisol



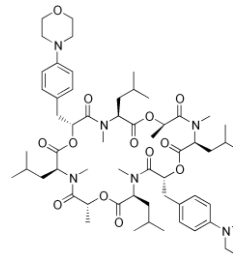
Avermectinas y milbemicinas



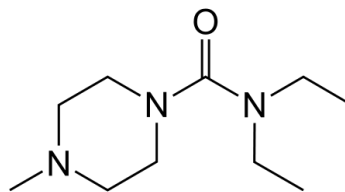
Tribendimidina



Emodepsida



Dietilcarbamazina



1.2.1 Benzimidazoles

Los benzimidazoles son drogas antihelmínticas de amplio espectro. La primera molécula de esta familia, el tiabendazol, fue descubierto en 1961²⁶. A partir de ahí fueron subsecuentemente introducidos nuevos benzimidazoles. Existe una extensa literatura que reporta numerosos efectos bioquímicos diferentes de los mismos. Sin embargo, es claro que su eficacia antihelmíntica radica en su capacidad de afectar el citoesqueleto mediante interacciones selectivas con la β -tubulina, sin afectar a la de los hospederos²⁷. Los efectos de los benzimidazoles en *C. elegans* incluyen la afectación de la locomoción, reproducción y de la calidad de los oocitos, lo cual es consistente con la interrupción de procesos que requieran microtúbulos íntegros²⁷.

Estudios en el organismo modelo *C. elegans*, un nematodo modelo de vida libre, revelaron que la sensibilidad a los benzimidazoles está mediada por un único gen, ben-1, el cual codifica para β -tubulina²⁸. Este hallazgo facilitó la búsqueda de las bases moleculares de la resistencia en gusanos parásitos. Interesantemente, se descubrió que la resistencia en *Haemonchus contortus*, el principal nematodo parásito ovino, está asociada a la presencia de alelos específicos de β -tubulina²⁹. Esto fue incluso llevado un paso más allá, al demostrarse que se puede recuperar la sensibilidad de *C. elegans* resistentes al expresar una isoforma específica de β -tubulina de *H. contortus* sensible. No obstante, lo mismo no ocurre si se utilizan alelos presentes en aislados resistentes de *H. contortus*³⁰. Esto fue una demostración inequívoca del mecanismo de acción de los benzimidazoles.

1.2.1 Levamisol, pirantel y morantel

Estos compuestos son nematicidas de amplio espectro, no siendo activos frente a céstodos o tremátodos. El primer compuesto disponible dentro de este grupo fue el tetramisol, introducido

en 1966. El mismo es una mezcla racémica de isómeros ópticos L y D. Posteriormente, se demostró que la actividad nematicida recaía principalmente en el isómero levógiro (L-tetramisol), al cual se le denominó levamisol. Esto permitió reducir a la mitad su dosis de acción y aumentar su margen de seguridad. Por otra parte, el pirantel y el morantel son estructuralmente similares entre ellos pero diferentes al levamisol²⁵.

Desde hace más de 40 años se sabe que el tetramisol y el pirantel actúan como agonistas de receptores nicotínicos. Los mismos provocan parálisis muscular espástica en los nematodos por la prolongada activación de receptores de acetilcolina de tipo nicotínico en la pared muscular^{31,32}. Estudios utilizando células de la pared muscular de *Ascaris suum* demostraron que el morantel, el pirantel y el levamisol simulan la acción de la acetilcolina, con el siguiente orden de potencia: morantel ~ pirantel > levamisol > acetilcolina³³. Interesantemente, el uso de estas moléculas en ensayos farmacológicos evidenció la existencia de subtipos de receptores de acetilcolina de tipo nicotínico; el tipo N (preferencialmente activados por nicotina), el tipo B (preferencialmente activados por befenio) y el tipo L (preferencialmente activados por levamisol y asociados a la resistencia al mismo)³⁴. Para esto fue indispensable el uso de *C. elegans* como modelo y de las drogas como herramientas farmacológicas para diseccionar los subtipos de receptores²⁵.

1.2.1 Avermectinas y milbemicinas

La ivermectina fue introducida como antihelmíntico en la década del 80 por Merck. Es un derivado semi sintético de la avermectina, la cual es una lactona macrocíclica producida por el microorganismo *Streptomyces avermitilis*. Es sumamente potente (≈ 7 nM) y de efecto persistente. Es de amplio espectro, presentando actividad tanto sobre parásitos internos (nemátodos) como externos (artrópodos). Sin embargo, no es activa sobre céstodos o tremátodos. Su descubrimiento entusiasmó a otras compañías a invertir en el desarrollo de análogos de la ivermectina como el moxidectin, la milbemicina oxima, la doramectina, la selamectina, la abamectina y la eprinomectina. *C. elegans* jugó un rol importante en el descubrimiento de varias de estas moléculas³⁵.

De acuerdo a diversos estudios la ivermectina provoca una potente y persistente parálisis en la faringe³⁶ y en la pared muscular del cuerpo del gusano³⁷. Se ha demostrado su interacción con una gran variedad de canales iónicos activados por ligandos incluyendo: receptores nicotínicos $\alpha 7$ ³⁸, canales de cloruro activados por acetilcolina³⁹, GABA⁴⁰, e histamina⁴¹, receptores de

glicina⁴² y receptores P2X4⁴³. Sin embargo, es su alta afinidad por canales de cloruro activados por glutamato la razón de su potente actividad antihelmíntica⁴⁴.

1.3 Problemas de trabajar con nematodos parásitos

Uno de los mayores problemas de trabajar con nematodos parásitos para el desarrollo de nuevos nematicidas es la complejidad de sus ciclos de vida; tardan demasiado tiempo y son costosos y difíciles de mantener en el laboratorio. De esta forma conseguir grandes números de gusanos para su estudio puede ser prácticamente imposible. De hecho, ninguno de los nematodos parásitos médicamente relevantes puede ser mantenido durante su ciclo de vida completo en ausencia de un hospedero. Algunos nematodos parásitos del ganado, con ciclos de vida sencillos como *Haemonchus contortus*, pueden ser mantenidos mediante infecciones experimentales en su hospedero. Sin embargo, esto es extremadamente laborioso y costoso, y la experimentación posible inherentemente limitada⁴⁵.

La imposibilidad de realizar genética en parásitos es otra limitante que frena el avance de la investigación en nematodos parásitos. Como se mencionó anteriormente, la identificación de los blancos farmacológicos de los antihelmínticos avanzó de forma significativa debido a la posibilidad de realizar mutagénesis y transgénesis en el organismo modelo *C. elegans*. Las herramientas genéticas disponibles para trabajar en nematodos parásitos son escasas, siendo la interferencia por ARN (ARNi) la más utilizada. De hecho, en muy pocos organismos hay posibilidades técnicas de generar organismos KO o transgénicos, y en estos casos las herramientas (por ejemplo, vectores disponibles) y los éxitos logrados son reducidos⁴⁵.

1.4 *C. elegans* como organismo modelo

En la década de los 60, Sidney Brenner planteó que el futuro de la biología molecular se encontraba en su extensión a otros campos, principalmente la biología del desarrollo y el sistema nervioso. Con la simpleza y el poder de la genética procariota en mente, propuso que un nematodo, *Caenorhabditis briggsae*, sería el sistema ideal para atacar esas interrogantes. Posteriormente, modificó levemente el foco de su investigación hacia el nemátodo relacionado *C. elegans* porque los gusanos *elegans* crecían mejor que los *briggsae* en sus aislados de laboratorio⁴⁶. Actualmente, *C. elegans* es activamente estudiado en más de 1.000 laboratorios

a nivel mundial con más de 1.200 artículos de investigación sobre *C. elegans* publicados cada año en los últimos 5 años⁴⁷.

C. elegans es un pequeño nematodo de vida libre que se encuentra en todo el mundo. Las larvas que emergen de huevos recién eclosionados miden 0,25 mm mientras que los adultos llegan a medir 1 mm. Tiene un ciclo de vida corto (3 días a 25°C desde huevo a adulto) y existe principalmente en forma hermafrodita auto fecundable; aunque aparecen machos con una frecuencia < 0,2%⁴⁷. Estas características han ayudado a convertir a *C. elegans* en un poderoso modelo de elección para estudios genéticos eucariotas, en particular en animales. Además, como el número de células somáticas en el animal es invariable, investigadores han sido capaces de seguir el destino de cada una de sus células desde la fertilización hasta la adultez, describiendo el linaje celular completo del animal a lo largo del ciclo de vida⁴⁸⁻⁵⁰. También se han logrado reconstruir la forma de cada una de las células del gusano a partir de micrografías electrónicas, incluyendo cada una de las 302 neuronas del hermafrodita adulto⁵¹ y el circuito neuronal de apareado del macho adulto⁵². Estas reconstrucciones permitieron obtener el conectoma neuronal más completo hasta el momento y ha ayudado a explicar como el dimorfismo sexual afecta los circuitos neuronales. Incluso, gracias a que el linaje celular y la neuroanatomía de *C. elegans* son invariables, las mutaciones que provocan cambios en el desarrollo o defectos en el comportamiento son fácilmente identificables en *screenings* genéticos. Por otra parte, *C. elegans* fue el primer organismo multicelular con el genoma completo secuenciado, lo que ha permitido la identificación de muchos genes clave en el desarrollo y en procesos celulares⁵³.

Las fortalezas experimentales y las grandes similitudes existentes entre los procesos moleculares y celulares presentes en *C. elegans* y los presentes en otros animales de la escala evolutiva (metabolismo, estructura de los organelos y función, regulación génica, biología de proteínas, etc) han convertido al gusano en un excelente organismo para el estudio de la biología de los metazoarios. Se estima que entre un 60 - 80% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans*⁵⁴ y que aproximadamente un 40% de los genes conocidos asociados a enfermedades humanas tienen ortólogos claros en el genoma de *C. elegans*⁵⁵. De esta forma, muchos descubrimientos hechos en *C. elegans* tienen relevancia para el estudio de enfermedades humanas y animales.

En el laboratorio, los animales son normalmente crecidos en placas con agar conteniendo un césped de la bacteria *Escherichia coli* como fuente de alimento. Su ciclo de vida completo es sumamente corto (Fig. 1)⁴⁷. La embriogénesis de *C. elegans* dura aproximadamente 16 horas a 20°C. Luego de la fertilización, se genera una "cáscara de huevo" que es prácticamente

impermeable, permitiendo un desarrollo completamente independiente de la madre. Sin embargo, los embriones son usualmente retenidos en el interior del hermafrodita hasta el estadio de 24 células, cuando son depositados. El embrión eclosiona ex utero cuando tiene 558 núcleos, transformándose en una larva L1. Los animales comienzan a alimentarse y desarrollarse a través de 4 estadios larvarios (L1-L4). El estadio L1 dura 16 horas, mientras los otros duran aproximadamente 12 horas. Cada estadio culmina con un período de inactividad llamado letargo, durante el cual se produce una nueva cutícula. Dicho letargo culmina con la muda de la cutícula anterior⁵⁶. Después de unas 12 horas de la muda de L4, los hermafroditas adultos comienzan a producir progenie por un período de 2 a 3 días, hasta que agotan sus reservas de esperma. Luego pueden generar una progenie adicional si se cruzan con machos. Finalizado el período reproductivo, los adultos pueden vivir alrededor de 2 semanas hasta morir de senescencia⁴⁷.

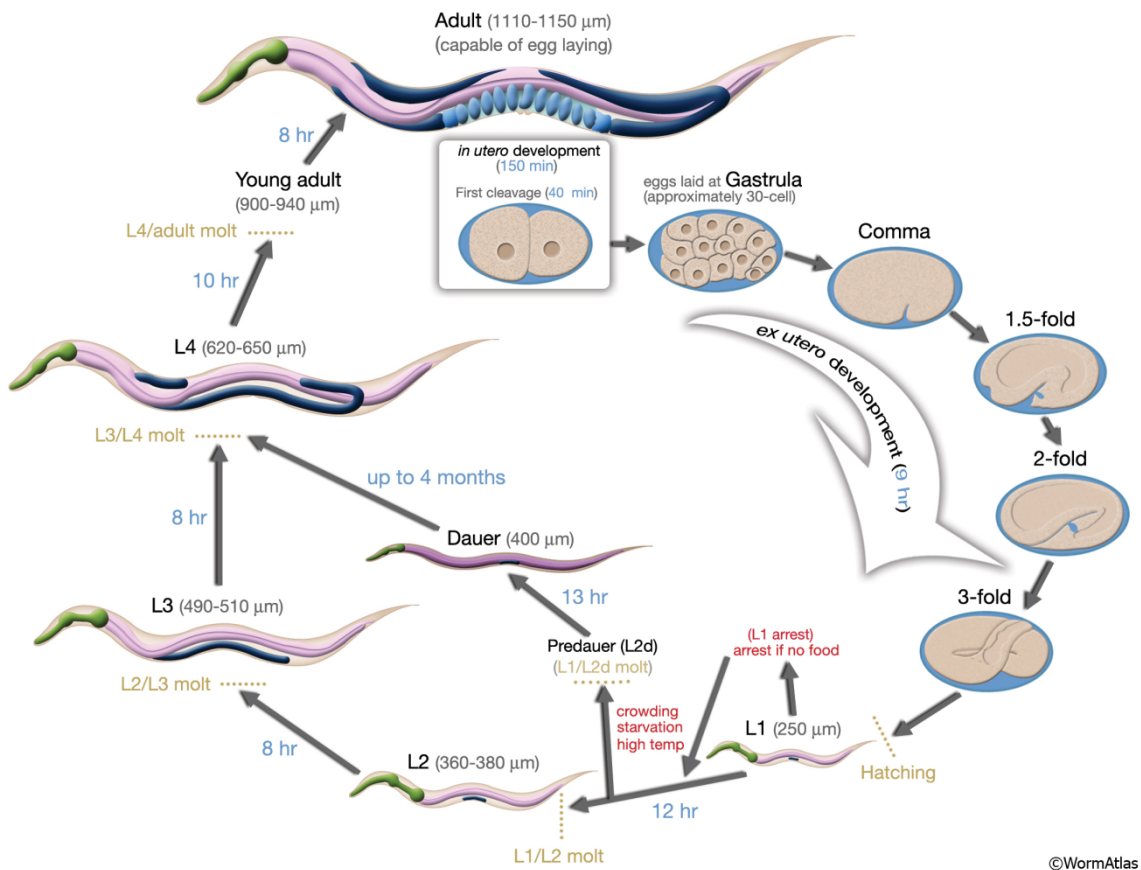


Figura 1: Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C (WormAtlas).

En condiciones estresantes como la ausencia de alimento, las larvas L1 pueden activar un ciclo de vida alternativo en el que mudan primero a L2d y luego a un estadio L3 diferente, la llamada larva "dauer" (Fig. 1)⁵⁷. La cutícula del dauer rodea completamente al animal tapando su boca,

lo que evita su alimentación y por consiguiente arresta su desarrollo. Esta nueva cutícula tiene además mayor resistencia química, otorgando al gusano una protección extra frente a estreses ambientales en general. Los gusanos en estadio dauer pueden sobrevivir por muchos meses y son la forma de dispersión más encontrada en la naturaleza⁵⁸. Cuando estas larvas son transferidas a placas con bacteria, las mismas mudan, se alimentan, y continúan su desarrollo para convertirse en larvas L4 levemente diferentes⁵⁷.

C. elegans presenta numerosas ventajas como modelo. Tiene un pequeño tamaño y una progenie numerosa, es fácil de crecer en el laboratorio, es barato de mantener, puede ser criopreservado por largo tiempo, tiene un tiempo de generación rápido, es transparente, genéticamente amigable, tiene un número de células y desarrollo invariables, y la expresión de sus genes puede ser reducida mediante ARNi por alimentación. Además, otro punto importante es que *C. elegans* no afecta al ser humano. De hecho, su incapacidad de crecer a temperatura corporal impide por completo su desarrollo dentro de seres humanos. Al mismo tiempo, hasta ahora no se han reportado reacciones alérgicas a *C. elegans*. En cambio, algunos nemátodos, como *Ascaris suum*, sí inducen reacciones alérgicas por lo que deben ser estudiados en campanas de ventilación⁴⁷.

Existen algunas otras características que facilitan el trabajo con *C. elegans*. Como un gusano hermafrodita se puede auto-fecundar, un sólo animal puede poblar toda una placa. Por otro lado, los animales pueden ser crecidos a temperaturas desde los 12°C a los 25°C. El crecimiento a diferentes temperaturas permite controlar la velocidad de desarrollo de los animales. El crecimiento continuo a más de 25°C no es posible porque los gusanos se vuelven estériles. Exposiciones cortas a mayores temperaturas son posibles y se suelen usar para generar shocks por temperatura o para aumentar la aparición de machos. Además, los cultivos de gusanos pueden ser sincronizados en su ciclo de vida exponiendo a adultos grávidos a tratamientos con hipoclorito e hidróxido de sodio. Asimismo, los gusanos pueden ser crecidos en medio líquido cuando es necesario obtenerlos en grandes cantidades. Finalmente, el equipamiento necesario para su estudio es económico y no requiere grandes inversiones⁴⁷.

Todo esto ha ayudado a que se hayan llevado a cabo numerosos descubrimientos a partir de estudios en *C. elegans* como los ejemplos mostrados en la tabla 4.

Tabla 4: Principales descubrimientos utilizando *C. elegans* como organismo modelo experimental.

Año	Descubrimiento
1974	Identificación de mutaciones que afectan el comportamiento animal ⁵⁹ .
1981	Identificación de mutaciones que afectan la sensibilidad al tacto ⁶⁰ .
1983	Primer linaje celular completo de un metazoario ⁴⁸⁻⁵⁰ .
1983	Descubrimiento de genes que regulan la apoptosis ⁶¹ .
1986	Primer diagrama completo del conectoma de un sistema nervioso ⁵¹ .
1987	Identificación de genes que guían a los axones ⁶² .
1993	Demostración de la señalización por insulina ⁶³ .
1993	Descubrimiento de los micro ARNs ⁶⁴ .
1994	Introducción de GFP como marcador biológico ⁶⁵ .
1998	Primer genoma animal secuenciado ⁵³ .
1998	Descubrimiento del ARN de interferencia ⁶⁶ .
2011	Descubrimiento de virus de nematodos ⁶⁷ .

1.5 *C. elegans* como “parásito” modelo

Uno de los problemas de utilizar nematodos parásitos para el descubrimiento de drogas nematicidas es la complejidad de sus ciclos de vida, lo que los vuelve costosos y hace que requieran de largos períodos de tiempo de crecimiento. Una alternativa es el uso de *C. elegans*; el cual tiene un ciclo de vida corto y sencillo. El mismo ya fue propuesto para el descubrimiento de drogas nematicidas desde hace más de 30 años⁶⁸. En ese momento sus únicos atributos positivos conocidos eran su facilidad de crecimiento y que los nematicidas comerciales existentes presentaban actividad sobre el gusano. Recién estaba comenzando a ganar reputación como modelo genético animal, hasta saltar definitivamente a la fama como el primer animal con el genoma completo secuenciado y por su linaje celular completo e invariante⁵³.

Desde 1998, la disponibilidad del genoma secuenciado y anotado de *C. elegans*^{53,69} (www.wormbase.org) fue seguido de la creación de una detallada base de datos de su

estructura anatómica (www.wormatlas.org) incluyendo su conectoma neuronal⁵¹, de un centro para almacenar y distribuir cepas (*Caenorhabditis elegans* Genetics Center) y de programas para proveer de knockouts para cada uno de los aproximadamente 20.000 genes de su genoma^{70,71}. Esta riqueza de recursos, sumada a la facilidad de realizar transgénesis en el gusano⁷², ha alentado a muchos científicos, incluyendo parasitólogos, a adoptar a este nematodo como modelo animal experimental²⁵.

Mediante análisis filogenéticos usando secuencias de ADN de la subunidad ribosomal menor, Blaxter y colaboradores propusieron la clasificación de las especies de nematodos en 5 clados⁷³. Hay nematodos parásitos presentes en cada uno de los 5 clados (Tabla 5) y los autores consideran que el fenómeno del parasitismo surgió de forma independiente por lo menos 3 y 4 veces para parásitos de plantas y animales, respectivamente⁷³. El clado V contiene a muchos de los principales gusanos parásitos. Entre ellos los parásitos humanos *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*, los parásitos veterinarios *Haemonchus contortus*, *Ostertagia osteragi* y *Cooperia oncophora*, y el parásito modelo capaz de infectar roedores *Nippostrongylus brasiliensis*. Interesantemente, *C. elegans* también pertenece al clado V^{73,74}.

Tabla 5: Ejemplos de especies de nemátodos clasificadas evolutivamente según información molecular⁷³.

Clado	Especie
I	<i>Longidorus elongatus</i>
	<i>Xiphinema rivesi</i>
II	<i>Trichodorus primitivus</i>
	<i>Prismatolaimus intermedius</i>
III	<i>Ascaris suum</i>
	<i>Ascaridia galli</i>
	<i>Brugia malayi</i>
IV	<i>Onchocerca volvulus</i>
	<i>Panagrellus redivivus</i>
	<i>Heterodera glycines</i>
	<i>Strongyloides stercoralis</i>
	<i>Globodera pallida</i>
V	<i>Meloidogyne arenaria</i>
	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	<i>Haemonchus contortus</i>
	<i>Necator americanus</i>
	<i>Ostertagia asteragi</i>
	<i>Ancylostoma duodenale</i>
	<i>Pristionchus pacificus</i>
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	

Existe una extensa evidencia de genes que son únicos al filo Nematoda. Incluso, se llega a afirmar que más de un 50% de los presuntos genes de nematodos son exclusivos al filo⁷⁵. Para algunas familias de genes, como los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico, existen miembros particulares de la familia que no están presentes en otros filos. De hecho, estos han aportado nuevos blancos de drogas nematocidas, como la subunidad nemato específica ACR-23, relacionada al blanco del monepantel⁷⁶. Por otra parte, no sorpresivamente, existe evidencia de genes de nemátodos asociados específicamente a aspectos de la vida parasítica. Además, dentro del filo hay una gran divergencia entre especies. Algunos autores estiman que hasta el 23% de los genes serían específicos para cada especie⁷⁵.

Claramente, el ciclo de vida de un organismo de vida libre como *C. elegans* es muy diferente al de especies parásitas, lo que ha provocado que los parasitólogos hayan puesto en duda su relevancia como modelo para estos usos⁷⁷. Sin embargo, más allá de sus diferentes hábitats, la anatomía de todas las especies del filo Nematoda es indudablemente similar. Estudios

comparativos de la genética de las especies, es decir, del ordenamiento del genoma, la sintenia y homología de genes muestran que parece haber una diversidad molecular considerable entre las especies de nematodos en general⁷⁸. A partir de esta información es razonable suponer que *C. elegans* no es más disímil a los nematodos parásitos de lo que las especies parasíticas son entre ellas.

1.6 *C. elegans* como modelo para la investigación en nematicidas

Por todos los atributos y ventajas antes mencionadas, *C. elegans* surge como una gran opción para realizar cribados de moléculas en busca de drogas. No obstante, hay que tener en cuenta ciertas consideraciones. Como nematodo de vida libre, *C. elegans* tiene mecanismos complejos y desarrollados de detoxificación, así como también una cutícula gruesa para evitar el daño de la gran cantidad de sustancias que pueden estar presentes en ambientes cambiantes como el suelo⁷⁹. Con el objetivo de superar estos obstáculos, existe un amplio abanico de opciones de ajustes posibles en el diseño de los ensayos. Algunos ejemplos son aumentar la concentración de los compuestos testeados, mejorar la accesibilidad al blanco agregando detergentes suaves como el tritón X-100 o el Tween-20, sensibilizar los gusanos con una baja concentración de un nematicida conocido, o usar gusanos mutantes, por ejemplo con las defensas a xenobióticos modificadas o con la integridad de la cutícula alterada⁸⁰. Otro problema de trabajar con *C. elegans* es que, al carecer este de ciertas rutas metabólicas de parásitos, algunas moléculas activas frente a parásitos pueden no ser detectadas. De todas formas, las ventajas de usar *C. elegans* como un filtro primario de cribado (sencillo, barato, de ciclo de vida corto, etc) superan enormemente sus desventajas.

En los últimos años se han llevado a cabo múltiples aproximaciones diferentes. Una de las más importantes fue un extenso cribado de ~ 60.000 compuestos químicos en *C. elegans* con los compuestos activos re-cribados en *Cooperia oncophora* y *H. contortus*⁸¹. Las moléculas que mataron a *C. elegans* tuvieron una probabilidad 15 veces mayor de matar a estos gusanos parásitos que moléculas elegidas al azar. Además, casi el 40% de las moléculas letales para *C. elegans* fueron también letales para ambos parásitos⁸¹. Esto confirma la utilidad de *C. elegans* para el descubrimiento de drogas nematicidas. Conjuntamente, los autores proponen una estrategia para el proceso de cribado que comenzaría con *C. elegans* como filtro primario, continuaría con nemátodos parásitos (por ejemplo: *C. oncophora*, *H. contortus*) para confirmar la actividad nematicida y finalizaría con modelos vertebrados (por ejemplo: células HEK293, zebrafish) para evaluar una posible toxicidad en el hospedero⁸¹.

Con respecto a *C. elegans*, muchos ensayos diferentes aplicables al cribado han sido desarrollados. Las variables más monitoreadas, generalmente de forma automática, suelen ser cambios en el metabolismo o en el comportamiento de los gusanos. En el caso del análisis del metabolismo, se han reportado ensayos con lecturas colorimétricas y de fluorescencia^{82,83}. En cuanto a los ensayos comportamentales, el rango de aproximaciones es más amplio. Mathew et al. reportaron el uso de un scanner para identificar reducciones en la motilidad⁸⁴. La intensidad de la luz producida por el scanner es suficiente para producir fototaxis negativa en los gusanos, lo que permite detectar a los que estén paralizados. Recientemente, Weaver et al. propusieron la implementación de un sistema de puntos para evaluar la salud de los gusanos afectados y evitar pasar por alto moléculas activas por utilizar aproximaciones binarias del tipo vivo/muerto⁸⁵. Además, existen numerosos sistemas automáticos para analizar cambios en el comportamiento, incluyendo el rastreo del movimiento del gusano o por interrupción de rayos infrarrojos, análisis de comportamientos específicos o generales, microfluídica, entre otros⁸⁶.

Además de ser un modelo para el descubrimiento de drogas, *C. elegans* también ha sido importante para definir los blancos moleculares de varias drogas nematocidas y para entender el complejo fenómeno de la resistencia a las mismas⁸⁷. La posibilidad de generar mutantes al azar en el laboratorio seguida de su selección en presencia de nematocidas puede simular el proceso natural que da lugar a la aparición de resistencia. La identificación de un gen mutado (o varios genes) que genere resistencia crea un *link*, ya sea directo o indirecto, entre el gen y el mecanismo de resistencia. Esta aproximación en *C. elegans* ha resultado importante para la identificación de blancos nematocidas, cascadas de señalización, metabólicas y de detoxificación⁸⁸. Una revisión de las contribuciones de *C. elegans* a este campo en específico fue recientemente publicada²⁵. Por ejemplo, *C. elegans* fue instrumental para identificar el blanco y las mutaciones del mismo que confieren resistencia al monepantel, una de las drogas nematocidas más recientes⁷⁶. El gusano modelo también es útil para descubrir nuevos blancos de drogas. Canales de cloruro activados por acetilcolina específicos de nematodos fueron validados como potenciales blancos nematocidas en un estudio basado en *C. elegans*⁸⁹. Esto fue determinado expresando ectópicamente AVR-15, un canal de cloruro que puede ser activado con ivermectina, en tejidos donde endógenamente se expresan los canales de cloruro activados por acetilcolina. De esta forma se utilizó la ivermectina para predecir el efecto de una droga agonista sobre los mismos.

1.7 Drug Discovery

El objetivo de todo programa de descubrimiento de drogas es desarrollar tratamientos eficaces y seguros para tratar las enfermedades humanas y animales. Gracias a los avances en la

tecnología utilizada en el descubrimiento de drogas, los tratamientos médicos han evolucionado notablemente. En los albores de la farmacología, las drogas terapéuticas eran usualmente obtenidas como derivados de plantas medicinales. Este fue, por ejemplo, el caso de la Aspirina, la cual se obtenía a partir de la corteza del Sauce. Muchas drogas también han sido descubiertas en investigaciones científicas pero de forma accidental. Estos descubrimientos accidentales positivos son usualmente referidos como serendipias⁹⁰.

Actualmente, los programas modernos de descubrimiento de drogas suelen comenzar con el cribado de bibliotecas químicas utilizando estrategias basadas ya sea en blancos (*target-based*) o en fenotipos (*phenotypic-based*). Antes de que los ensayos *target-based* se volvieran populares, los ensayos *phenotypic-based* eran la base del descubrimiento de drogas farmacéuticas (Fig. 2). Sin embargo, en los últimos 25 años los cribados del tipo *target-based* se convirtieron en el paradigma de la industria farmacéutica y los centros de investigación. Más recientemente, en cambio, surgió un renovado interés de usar ensayos fenotípicos como una forma de reactivar el descubrimiento de drogas⁹¹.

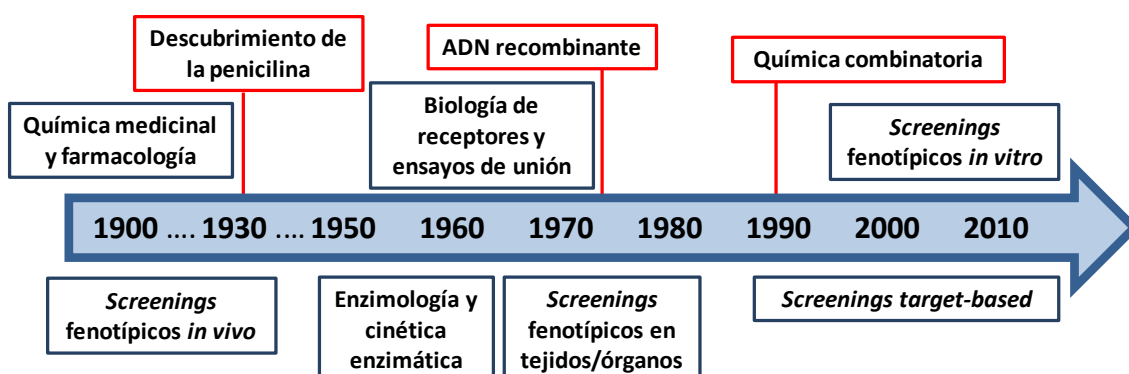


Figura 2: Evolución del descubrimiento de drogas. Adaptado de⁹¹.

1.7.1 Target-based drug discovery

La base para el desarrollo de drogas a partir de blancos moleculares comenzó con los grandes avances en farmacología y química sintética y medicinal que se dieron desde comienzos del siglo XX. La profundidad de la investigación realizada en las décadas de 1950 y 1960 en enzimología y cinética enzimática proporcionó métodos precisos para el cálculo de la potencia de los compuestos (IC50) y su eficacia (% de inhibición)⁹². Cientos de enzimas fueron descubiertas y estudiadas durante este período, convirtiéndose luego en importantes blancos moleculares para el descubrimiento de drogas⁹². La metodología de la cinética enzimática se amplió a la farmacología de los receptores en la década de 1970⁹³; más allá de que la

estructura molecular de los receptores permaneció inexplorada en ese momento. El aumento de las investigaciones en la farmacología de los receptores y su drogabilidad convirtió a los receptores en los blancos de drogas más populares⁹⁴. Además, los avances tecnológicos de la biología molecular de la década de 1980, como el ADN recombinante, permitieron el cribado de grandes bibliotecas químicas en ensayos utilizando proteínas recombinantes purificadas^{95,96}. Por otro lado, los desarrollos en química combinatoria, miniaturización de ensayos y automatización robótica, han ayudado al rápido avance de los cribados *high-throughput* (HTP) desde aproximadamente 1990 en adelante⁹⁷.

El descubrimiento de drogas por aproximaciones del tipo *target-based*, también llamado farmacología reversa, generalmente comienza con la identificación de un blanco para una enfermedad de interés (Fig. 3)⁹⁸. Dichos blancos moleculares suelen ser descubiertos en investigación básica, en estudios en modelos animales u observaciones clínicas de pacientes. Por ejemplo, la función anormal de una proteína en particular, de una cascada de señalización, o una mutación pueden ser identificadas como la causa de una enfermedad. Una vez que el potencial blanco es validado, comienza el desarrollo de un ensayo para ser utilizado en campañas de cribado de bibliotecas químicas, de forma de encontrar inhibidores enzimáticos o agonistas del receptor, por ejemplo. Los compuestos con mayor actividad son los llamados “*leads*”, que luego de ser confirmados y validados pasan a una etapa de optimización. Es en este momento que se estudia la relación *scaffold*/actividad, se busca una favorable absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), y se intentan predecir las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los compuestos. Es así como solo algunos *leads* con mecanismo de acción y eficacia conocidos pasan a una etapa preclínica de estudios toxicológicos y luego, idealmente, a ensayos clínicos⁹⁸.

En los últimos 20 años, los cribados en formato *target-based* se han convertido en la estrategia de descubrimiento de drogas más utilizada. Los receptores asociados a proteína G, canales iónicos y enzimas en general, son los blancos de drogas más comunes y exitosos^{95,96}. Es interesante notar como todos los biológicos aprobados para el tratamiento de enfermedades humanas surgieron de estrategias del tipo *target-based*⁹⁹. Esto puede explicarse ya que, en contraste con los pequeños compuestos químicos, los biológicos como las proteínas (anticuerpos, enzimas, etc), hormonas, péptidos y componentes de la sangre tienen naturalmente mecanismos de acción sobre blancos específicos en los organismos.

Sin lugar a dudas, los cribados del tipo *target-based* tienen muchas ventajas sobre los cribados fenotípicos (Tabla 6). Por ejemplo, conocer el blanco molecular y contar desde un comienzo con un ensayo que mida su actividad es muy beneficioso en las etapas de optimización de la

actividad de los *leads*. Sin embargo, se han comenzado a notar sus limitaciones. Análisis recientes han revelado un gran porcentaje de resultados negativos en fases clínicas II y III, principalmente debidos a falta de eficacia de las drogas^{100,101}. Aunque la falta de eficacia de las drogas en fases avanzadas puede deberse a múltiples factores, la invalidez de la relación blanco enfermedad es una de las razones más importantes para la cantidad de drogas candidatas fallidas. Por otro lado, el número de blancos drogables validados para el desarrollo de drogas es sustancialmente menor al previsto^{96,102}.

El gran potencial de la estrategia de cribado del tipo *target-based* está actualmente en duda. Estudios recientes han mostrado que entre 1999 y 2008, la FDA aprobó 45 nuevas familias de drogas. Interesantemente, más allá de que la estrategia *target-based* es la más utilizada, sólo 17 de ellas fueron descubiertas mediante esta aproximación, mientras que 28 lo fueron en cribados fenotípicos⁹⁹. Esto ha contribuido al creciente interés y reconsideración de los ensayos fenotípicos, tanto en la industria farmacéutica como en los centros de investigación. Se tiene la esperanza que su aplicación mejore los pobres índices de éxito actuales presentes en fases clínicas.

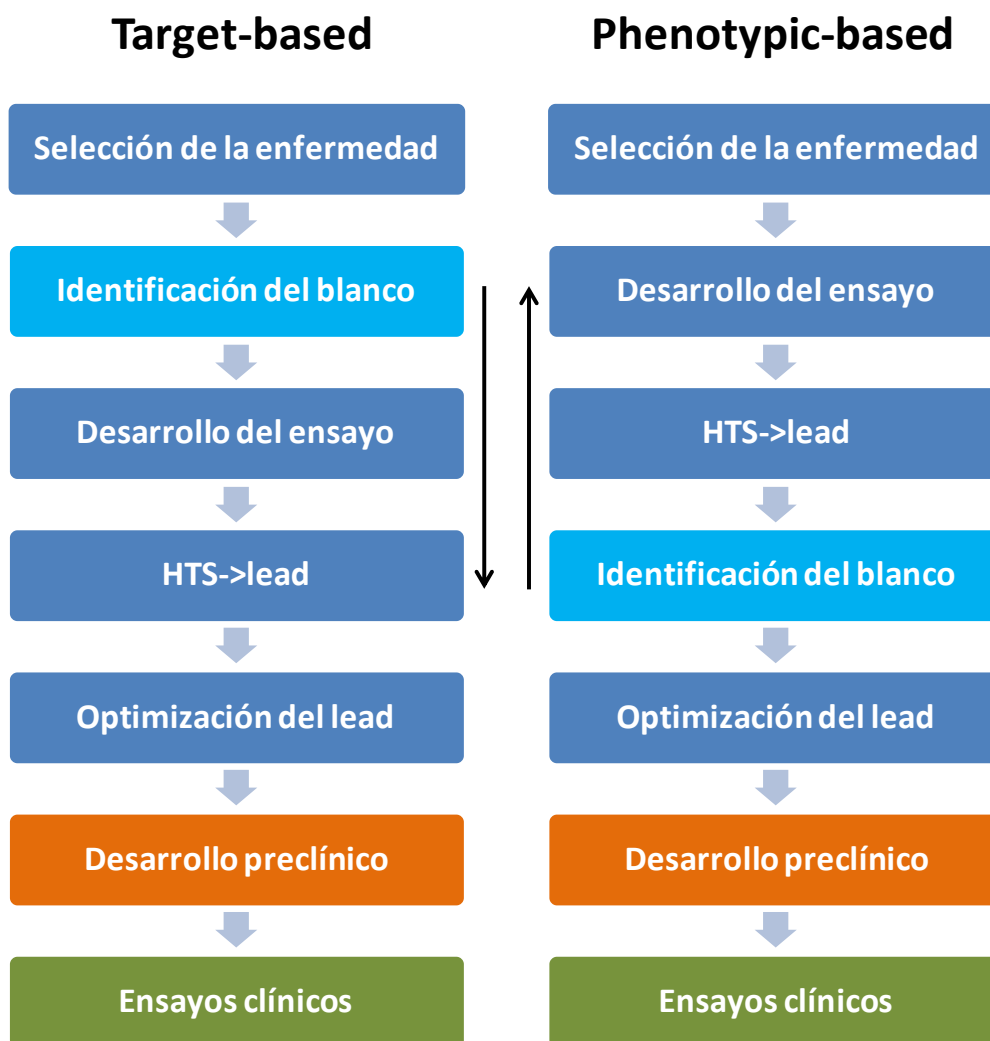


Figura 3: Esquema de los pasos seguidos en las estrategias *target-based* y *phenotypic-based* para la búsqueda de drogas. Adaptado de⁹¹.

1.7.2 Phenotypic-based drug discovery

Históricamente, el descubrimiento de drogas fue fenotípico por naturaleza; las drogas podían ser descubiertas accidentalmente, como el caso de la penicilina, o mediante ensayos bactericidas diseñados para descubrir antibióticos adicionales¹⁰³. En el descubrimiento de drogas mediante cribados fenotípicos, o farmacología clásica, se busca un efecto (un fenotipo), pero se desconoce el mecanismo molecular afectado. De hecho el blanco farmacológico puede permanecer desconocido, incluso luego de determinar la actividad y eficacia de una droga^{98,104}. La estrategia comienza, en general, con el desarrollo de un ensayo en base a una característica asociada a una enfermedad de interés (Fig. 3). Posteriormente, se prueban bibliotecas de compuestos frente a dicho ensayo. De esta forma se buscan identificar leads que

revertan el fenotipo de la enfermedad; por ejemplo eliminando selectivamente patógenos o células cancerígenas de cultivos celulares¹⁰⁵.

En los últimos años se han desarrollado muchos ensayos en organismos enteros como *C. elegans*, zebrafish, *Xenopus laevis* y *Drosophila melanogaster*¹⁰⁶. Los cribados fenotípicos en animales modelo pueden aportar información de absorción, distribución, metabolismo y toxicidad de compuestos (Tabla 6). Además, dichos ensayos tienen la ventaja de que suelen ser más relevantes fisiológicamente y menos artificiales al utilizar células u organismos intactos y el ambiente nativo de éstos. Los hits primarios obtenidos en este tipo de aproximaciones pueden potencialmente tener como blanco diferentes tipos de biomoléculas (receptores, enzimas, factores de transcripción, entre otros) e incluso múltiples cascadas de señalización. Los compuestos *leads* pueden ser seleccionados sin conocer el blanco, aunque su identificación puede facilitar la optimización de dichos *leads*. El proceso de farmacología clásica permite descubrir drogas sin blancos conocidos o validados. Por lo tanto, puede ser útil para enfermedades poco estudiadas o para las que se quiera descubrir nuevos blancos farmacológicos⁹¹.

Estudios retrospectivos muestran que la FDA ha aprobado muchas drogas que no contaran con un mecanismo de acción conocido¹⁰⁷. No sorpresivamente, muchas de estas drogas fueron descubiertas por cribados fenotípicos. Un famoso ejemplo de droga aprobada sin un mecanismo de acción conocido es la aspirina (ácido acetilsalicílico). De hecho, su determinación requirió de casi 100 años¹⁰⁸. Incluso actualmente, las agencias regulatorias alrededor del mundo aprueban nuevas drogas sin ser necesario presentar su mecanismo de acción, siempre que sean eficaces y seguras para los pacientes⁹¹.

Tabla 6: Ventajas y desventajas de las estrategias *target-based* y *phenotypic-based* para la búsqueda de drogas. Adaptado de⁹¹.

Característica	Target-based screening		Phenotypic-based screening	
	Ventaja	Desventaja	Ventaja	Desventaja
Blanco molecular	Conocido	Hay que conocerlo	No es necesario conocerlo	No es conocido
Throughput del cribado; ensayo	Alto; relativamente sencillo de desarrollar	El ensayo puede no ser biológicamente relevante	Medio; biológicamente relevante	Puede ser bajo; el costo puede ser alto
Mecanismo de acción del compuesto lead	Conocido al comienzo, puede acelerar el desarrollo preclínico	Limitada posibilidad de identificar un nuevo mecanismo	Múltiple blancos y vías pueden ser inhibidas, incluyendo mecanismos complejos	Desconocido al comienzo
Confirmación del compuesto lead	Métodos biofísicos como cristalografías	Necesita reconfirmarse en ensayos fenotípicos	Se puede avanzar a estudios in vivo rápidamente	La identificación del blanco puede ser cara y lenta
Optimización scaffold/actividad	Sencilla y directa			Puede necesitarse desarrollar ensayos sobre el blanco
Relevancia del lead para la enfermedad	Directa si el blanco es relevante	Puede no ser relevante y recién advertirse en etapas clínicas avanzadas	Usualmente relevante, permite encontrar blancos de enfermedades complejas	

1.8 Librerías de compuestos para cribado

Una de las bases del éxito para identificar nuevos compuestos activos contra blancos identificados es la colección de compuestos con los que se realizan los ensayos biológicos. El objetivo de una librería para cribado es, idealmente, contener múltiples compuestos que se unan con una potencia visible a cada hendidura drogable de cada proteína de interés terapéutico¹⁰⁹.

En teoría, una buena librería sería aquella que contenga una gran cantidad de diversos “*scaffolds*” funcionalizados de muchas formas diferentes¹¹⁰. Además, debería evitar contener compuestos inestables, impuros, promiscuos, demasiado complejos, con funcionalidades no deseadas o que causen interferencia en los ensayos^{111,112}.

En la práctica, la realidad es más compleja. El espacio químico es enorme y ninguna librería (aunque sea de millones de compuestos) puede ser capaz de representar completamente la diversidad posible. Hay trillones de moléculas que podrían ser creadas y millones que pueden ser compradas¹¹³. La pregunta es: ¿qué tipo de moléculas deberían estar presentes en el set a utilizar?

1.8.1 Productos naturales

Desde tiempos inmemoriales el ser humano ha recurrido a la flora y fauna para curar sus enfermedades. Estos conocimientos acumulados en el folklore y la cultura han sido la base de las farmacopeas durante siglos¹¹⁴. Históricamente, los productos naturales han sido la mayor fuente de principios activos¹¹⁵. Es ampliamente aceptado, que antes del advenimiento de las nuevas tecnologías de *high-throughput* y la era post genómica, más del 80% de las drogas eran productos naturales o habían sido inspirados por estos. Incluso hoy en día una gran cantidad de fármacos siguen estando basados en productos naturales, sobre todo cuando se trata de nuevas clases de drogas¹¹⁶. Estudios estiman que menos del 40% de las drogas que surgieron entre 1980 y 2010 son puramente sintéticas¹¹⁷.

Más allá del gran éxito del uso de productos naturales, muchas compañías farmacéuticas han disminuido el uso de los mismos en sus proyectos de descubrimiento de fármacos. Esto se ha dado por numerosas razones¹¹⁸⁻¹²⁰:

1: Costos: Generar y mantener una colección de productos naturales de alta calidad puede ser sumamente costoso. Esta es una de las principales razones por las cuales dichas librerías son

realizadas por grandes organizaciones o empresas farmacéuticas; quedando fuera del alcance de compañías más pequeñas o start-ups.

2: Tiempo: Luego de que un extracto es identificado como hit, este debe ser fraccionado utilizando como guía el bioensayo, de forma de poder determinar cuál es la fracción con el principio activo. Este proceso puede volverse largo y no siempre es compatible con los tiempos de las campañas de cribado actuales, las cuales en general son de corta duración.

3: Novedad: Una vez que el principio activo es aislado, su novedad es impredecible. Se requiere de sucesivos pasos de caracterización. Luego de la dilucidación puede incluso que el compuesto no sea patentable o ya haya sido patentado por la competencia.

4: Trazabilidad: Los productos naturales suelen ser estructuralmente complejos. Por lo tanto, identificar la parte de su estructura que otorga actividad (farmacóforo) puede ser un gran desafío. Incluso compuestos naturales de baja complejidad suelen ser descartados frente a compuestos sintéticos de igual potencia, principalmente porque estos últimos ya tienen una ruta de síntesis conocida.

5: Escalado: Los principios activos suelen ser componentes minoritarios en los extractos naturales. Su obtención en grandes cantidades, en caso de no poder ser sintetizados químicamente, podrá depender de fermentaciones a gran escala, lo cual puede ser un factor limitante para continuar su desarrollo a una etapa pre clínica.

6: Propiedad intelectual: Actualmente los países defienden su biodiversidad con mayor recelo. Obtener autorización para recolectar muestras puede ser un proceso largo y burocrático. Además, luego de descubierta una potencial droga, la negociación de los derechos de propiedad intelectual y como repartir los porcentajes de las regalías puede ser un asunto de gran complejidad.

En este contexto, la síntesis química combinatoria fue postulada como una de las grandes candidatas a proveer de nuevas entidades químicas. Sin embargo, la misma falló en cumplir con las expectativas. La disminución del uso de productos naturales produjo un descenso del total de nuevas familias químicas que llegan al mercado. Esto se explica principalmente porque la síntesis química no fue capaz de igualar su éxito^{121,122}.

La composición de las librerías químicas suele ser una de sus mayores limitantes. La diversidad que puede ser conseguida por estas no es comparable a la obtenida por la naturaleza. Estas últimas presentan una vasta diversidad química que se encuentra evolutivamente optimizada para interaccionar con macro-moléculas biológicas. Los productos naturales pueden ser pensados como “pre validados” por la naturaleza. En principio, todos los

compuestos biosintetizados tendrían una actividad biológica que otorga beneficios al organismo que los produce¹²³. La complejidad y diversidad molecular que se puede obtener a partir de fuentes naturales es enorme (ejemplos en Fig. 4), lo cual permitiría, en el caso particular de los nematocidas, obtener nuevas clases que no estén afectados por las resistencias actuales. Esto es así porque normalmente al surgir una resistencia, esta surge para todos las drogas de su clase. Otra ventaja a destacar de los compuestos naturales es que suelen presentar mecanismos de acción altamente específicos¹²⁴.

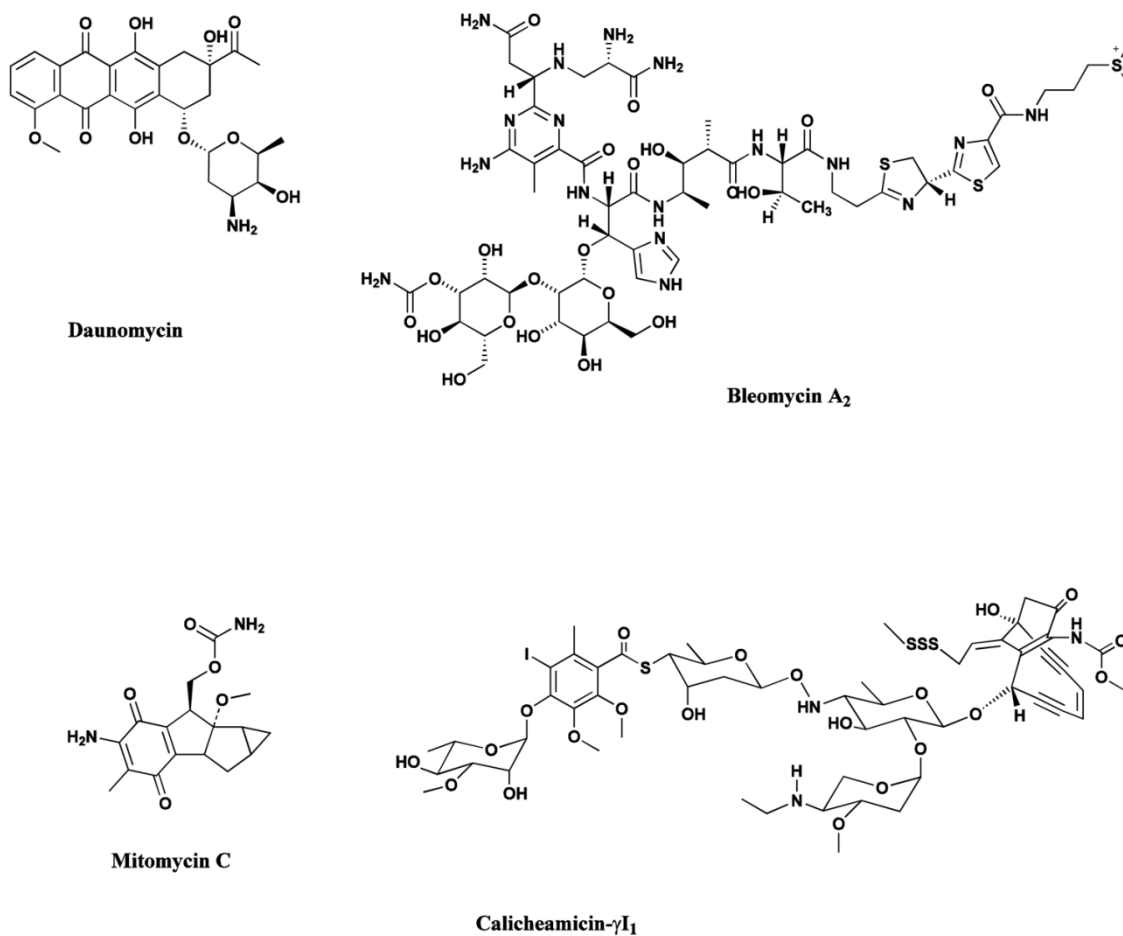


Figura 4: Ejemplos de fármacos derivados de fuentes naturales utilizados en la terapia contra el cáncer¹²⁴.

Se podría pensar que esto sólo tendría sentido para compuestos que compartan nicho ecológico con su diana. Parecería ilógico, por ejemplo, que un microorganismo del lecho marino produzca un modulador específico para una proteína humana con la que nunca está en contacto. Sin embargo, la historia del descubrimiento de drogas está llena de estos sorprendentes ejemplos. La razón de este tipo de coincidencia posiblemente se base en la naturaleza finita del espacio biológico. La mayoría de las proteínas o ácidos nucleicos diana

están formados por los mismos bloques de construcción en todas las especies. Entonces, aunque el blanco original de un compuesto natural pueda no ser el mismo que el buscado al realizar un cribado, pueden haber dominios estructurales que se comparten¹²⁵.

Más allá de las grandes ventajas de los productos naturales, se trata de un área poco explorada. Se estima que solamente el 6% de las plantas vasculares han sido estudiadas con objetivos farmacológicos¹²⁶. Por otro lado, el potencial existente en los ecosistemas marinos permanece virtualmente inexplorado¹²⁷. Las esponjas, en particular, han sido de las principales fuentes de productos naturales de origen marino desde los años 70. Las mismas son capaces de producir una gran diversidad de compuestos de los cuales la mayoría no tienen análogos cercanos en plantas, microorganismos u otros organismos marinos¹²⁸.

1.8.2 Librerías de compuestos químicos sintéticos

El área del descubrimiento de drogas ha sufrido grandes cambios en los últimos años. La cantidad de blancos biológicos presuntos se ha multiplicado, principalmente gracias al avance de la genómica y la proteómica. Además, se han desarrollado sistemas automáticos de cribado de alto rendimiento capaces de evaluar la acción biológica de enormes números de moléculas. Todo esto ha creado la necesidad de generar bibliotecas químicas de mayor tamaño^{129,130}.

Uno de los nuevos mecanismos por los cuales se pueden generar grandes bibliotecas, es empleando la llamada química combinatoria. La misma se basa en la mezcla de numerosos “bloques de construcción” de forma de obtener todas sus posibles combinaciones. La clave de este tipo de síntesis es que todas las reacciones se lleven a cabo bajo condiciones similares. Esto otorga su principal ventaja frente a la síntesis química tradicional: la capacidad de obtener cientos de compuestos diferentes en un corto período de tiempo¹³¹.

Mediante química orgánica tradicional, dos materiales iniciales A y B reaccionan para formar un único producto A-B. Por otro lado, mediante química combinatoria, un set de compuestos del tipo A (A_1 a A_n) reaccionan con un set de compuestos del tipo B (B_1 a B_n) para formar una librería de compuestos A_x-B_x . Dependiendo de la estrategia de síntesis empleada, la combinación obtenida puede ser una mezcla o una colección de compuestos discretos separados^{131,132}.

El proceso de descubrimiento de drogas suele comenzar con el cribado de moléculas como potenciales agentes terapéuticos. Luego, estos hits primarios pasan a siguientes etapas de optimización hasta llegar a ser candidatos para fármacos. Tradicionalmente, los intentos de cribado de moléculas de alto rendimiento se basaban en la premisa de que la probabilidad de encontrar una entidad activa era proporcional al número de moléculas testeadas en ensayos biológicos. Con el tiempo, al no obtenerse suficientes compuestos activos, el concepto fue cambiando hacia el diseño un poco más racional de las librerías.

El primer objetivo del proceso de descubrimiento de drogas es identificar compuestos con actividades interesantes. Como es prácticamente imposible cubrir las 10^{63} posibilidades del espacio químico de moléculas que puedan ser potenciales drogas¹³¹, una razonable primera aproximación es testear la mayor cantidad de “*scaffolds*” posibles. Las bibliotecas primarias deben ser tan diversas como sea posible, especialmente cuando se cuenta con información limitada sobre el blanco objetivo¹³³.

Los cribados primarios generalmente requieren de una pequeña cantidad de compuesto (usualmente 1-2 mg), y suelen contener entre 1.000 y 10.000 compuestos diferentes. En esta etapa es importante elegir que bloques de construcción utilizar para generar los compuestos finales. Los mismos deben ser aquellos que sean más prometedores para volverse “*leads*”¹³¹. Tomando como ejemplo las drogas que afectan blancos en el sistema nervioso central, hay ciertos elementos que suelen estar más o menos presentes en las drogas comerciales (Tabla 7)¹³⁴. Entonces, al diseñar una librería hay que prestar especial atención a dichos caracteres, además de factores como el peso molecular, hidrofobicidad, etc.

Tabla 7: Grupos funcionales más comunes en drogas comerciales que actúan sobre el Sistema Nervioso Central¹³⁴.

Grupo funcional	Frecuencia (%)
Aromático	83
Amina	63
Amida	38
Alcohol/fenol	21
Ester	10
Ácido	4

Los compuestos positivos más interesantes obtenidos en el cribado, tanto de librerías de compuestos sintéticos como de productos naturales deben luego ser optimizados. Algunos de

los factores más importantes a optimizar suelen ser la afinidad al ligando blanco y su selectividad. Por otro lado, el perfil farmacocinético de la futura droga es de suma importancia. Se estima que aproximadamente el 40% de los candidatos a drogas fracasan en ensayos clínicos tempranos por esta razón¹³⁵.

1.9 Definición de la propuesta

Como fue mostrado anteriormente, se ha encontrado resistencia a todos los grupos químicos más utilizados como nematicidas, siendo además esta resistencia alta y en aumento. Surge por lo tanto la necesidad de desarrollar nuevas drogas antihelmínticas efectivas y que puedan ser combinadas con las actuales para reducir la aparición de resistencia. La identificación de nuevos blancos o moléculas suele ser uno de los mayores obstáculos en el desarrollo de nuevas drogas. Además, realizar *screenings* en los organismos hospederos suele ser muy caro, complejo e incluso puede enfrentar problemas éticos. Sin embargo, el uso del nematodo modelo *C. elegans* resulta beneficioso para estas aproximaciones, entre otras razones, por su simplicidad.

Por lo tanto, la propuesta se basa en 2 módulos diferentes: búsqueda de compuestos nematicidas utilizando una estrategia fenotípica y búsqueda de nuevos blancos nematicidas mediante ensayos con ARNi (ARN interferente de la expresión génica).

1.9.1 Búsqueda de drogas nematicidas

Se propone la búsqueda de moléculas nematicidas, principalmente mediante el uso de Nature Bank™ de la Griffith University y de algunas otras bibliotecas más pequeñas. Nature Bank es una biblioteca de extractos de una gran diversidad de plantas e invertebrados marinos del sudeste asiático y Oceanía. La misma comprende más de 63.000 muestras de diferentes organismos, a partir de los cuales se han generado más de 40.000 extractos y 200.000 fracciones. Dichas fracciones son obtenidas de acuerdo a su hidrofobicidad mediante HPLC, obteniéndose 5 fracciones por cada extracto. La biblioteca se encuentra además enriquecida en compuestos que pueden ser potenciales fármacos, siguiendo las recomendaciones de la regla de cinco de Lipinski¹³⁶.

Para el análisis de una gran biblioteca de compuestos como ésta es necesaria una aproximación automatizada de tipo *High-Throughput Screening*. Se propone una prueba de concepto de una metodología de este tipo utilizando 10.240 fracciones de las presentes en la librería completa por duplicado en un ensayo de alto rendimiento utilizando el organismo entero (*C. elegans*). Para dicho cribado se propone el uso del equipo Wmicrotracker™, el cual es un equipo capaz de medir de una forma rápida, sencilla y reproducible el movimiento de *C. elegans* en placas de microtitulación¹³⁷. Es importante recordar que los compuestos antihelmínticos afectan la locomoción de los gusanos, en algunos casos de forma directa inhibiendo canales iónicos. Asimismo, es importante recordar que los nematocidas conocidos también tienen efecto letal sobre *C. elegans* y de hecho los mecanismos de acción de algunos de ellos han sido dilucidados utilizando *C. elegans* como modelo^{86,138}.

Se propone un “*pipeline*” general (Fig. 5), en el que luego de identificados extractos con actividad nematocida se procede a realizar estudios de dosis respuesta para analizar su potencia. Posteriormente se evalúa su actividad nematocida frente a un nemátodo parásito como *H. contortus* y se determina la acción de dicho compuesto ante larvas de zebrafish para evaluar su inocuidad/toxicidad frente a vertebrados. El *pipeline* general, pero que escapa a los objetivos de este trabajo, incluiría además pruebas de toxicidad en ratones y estudios a campo para completar el proceso de descubrimiento de drogas nematocidas.

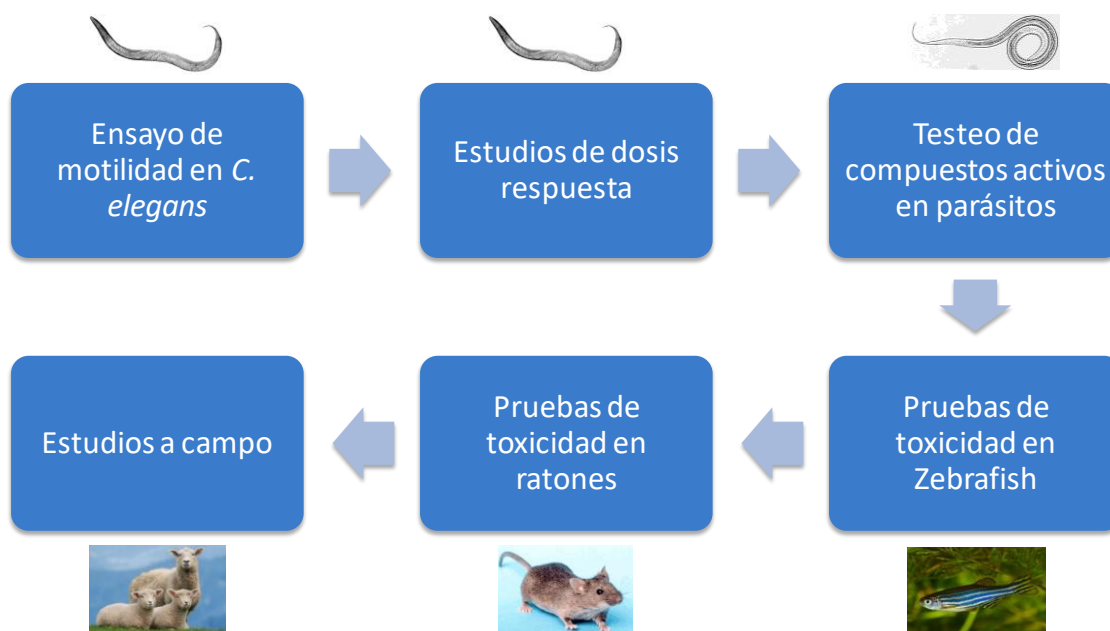


Figura 5: “*Pipeline*” general propuesto para el descubrimiento de drogas nematocidas.

1.9.2 Búsqueda de blancos nematocidas

El segundo módulo consiste en el uso de ensayos comportamentales de tipo “*burrowing*” en el nematodo de vida libre *C. elegans*. Estos ensayos evalúan la capacidad de los gusanos de excavar y atravesar geles de agar al estar expuestos a diversas drogas o condiciones. La clave de los ensayos radica en la simulación de las barreras biológicas (matriz extracelular, membranas, tejidos) que los gusanos parásitos tienen que atravesar en los organismos que infectan. Si los gusanos tienen estas facultades alteradas, no serán capaces de completar su ciclo de vida. El ensayo de excavación de agar no supone superar una barrera biológica estrictamente, pero si requiere de un gusano capaz de atravesar una barrera física, y vigor neuromuscular también necesario para atravesar las barreras biológicas encontradas por los nematodos. Si los gusanos tienen estas facultades alteradas, no serán capaces de completar su ciclo de vida.

Se propone la identificación de genes específicos de nematodos responsables de este comportamiento, ya que las proteínas codificadas por éstos representan blancos farmacológicos clave para el ciclo de vida de estos organismos. Para esto se lleva a cabo un cribado con *C. elegans* de una biblioteca de ARNi (ARN interferente de la expresión génica) de todos los genes que *C. elegans* tiene en común con nematodos parásitos, pero no con vertebrados, de forma de obtener blancos altamente selectivos. En total este *screening* implica evaluar en microplacas la interferencia de aproximadamente 800 genes en el comportamiento de “*burrowing*”. El Dr. Vidal Gadea, responsable del Molecular Neuroethology Lab de la Illinois State University ha diseñado y puesto a punto estos ensayos comportamentales en *C. elegans* pero aplicados al estudio de la distrofia muscular. Los mismos serían adaptables para el descubrimiento de blancos farmacológicos específicos de nematodos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es la búsqueda y descubrimiento de drogas y blancos nematocidas utilizando el organismo modelo *C. elegans*.

2.2 Objetivos Específicos

Para poder cumplir con el objetivo general de este trabajo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de un ensayo de motilidad de *C. elegans* utilizando el equipo WMicrotracker.
- Prueba de concepto del ensayo mediante el cribado de una biblioteca química anteriormente cribada por un laboratorio independiente.
- Búsqueda de nuevos compuestos nematocidas de librerías de productos químicos sintéticos.
- Búsqueda de nuevos compuestos nematocidas de librerías de productos naturales.
- Estudios de toxicidad de compuestos nematocidas en el vertebrado modelo zebrafish.
- Búsqueda de nuevos blancos nematocidas a través de un ensayo de interferencia génica en *C. elegans*.

3. METODOLOGÍA

3.1 Materiales

El levamisol y la ivermectina fueron obtenidos de Cibeles S.A. El “Pathogen Box” fue ofrecido por Medicines for Malaria Ventures. La biblioteca LIDENSA utilizada en el cribado de compuestos sintéticos fue sintetizada por Guzmán Álvarez del Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Regional Norte, UdelaR. Esta biblioteca contiene más de 2.000 compuestos, de los cuales se utilizaron 175 en este trabajo. “Nature Bank” forma parte de una colaboración con la Griffith University. El resto de los reactivos utilizados fueron adquiridos a SIGMA Chemical Company.

Las cepas de *C. elegans*: N2 Bristol (WT) y TU3311 fueron obtenidas del Caenorhabditis Genomics Center (CGC). La primera fue utilizada en todos los ensayos menos en los de interferencia. La cepa de *Escherichia coli* utilizada, OP50, también fue obtenida del CGC. Las larvas L3 de *Haemonchus* spp. fueron gentilmente provistas por la Dra. Laura Domínguez. Para los ensayos con zebrafish se utilizaron peces WT del acuario del Institut Pasteur de Montevideo.

El equipo para la medición de la motilidad es “WMicrotracker™ ONE” y fue comprado a PhylumTech.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtención de las muestras de Nature Bank

El procedimiento fue realizado por la Griffith University. En primer lugar, se remueven los lípidos de muestras de 300 mg de biota utilizando 3 veces 7 mL de etanol. Luego se evapora el alcohol y se agregan 600 µL de DMSO. Los extractos son subdivididos en 5 fracciones utilizando una columna de HPLC C18 monolítica. El método de gradiente de HPLC comienza con 10% de metanol, aumentando de 10% a 50% de metanol en 3 minutos a un flujo de 4

mL/min, seguido de un gradiente convexo hasta 100% de metanol en 3,5 minutos a 3 mL/min. Se mantiene el metanol al 100% por 0,5 minutos a un flujo de 3 mL/min y luego por 1 minuto a 4 mL/min. Finalmente, se hace un gradiente lineal hasta 10% de metanol en 1 minuto a 4 mL/min, el cual es mantenido por 2 minutos en las mismas condiciones. Las fracciones son recogidas desde el minuto 2 al 7 y las mismas son luego secadas. El protocolo modificado incluye etanol en sustitución del metanol.

3.2.2 Mantenimiento de *C. elegans*

Los gusanos son mantenidos y crecidos a 20°C en placas de petri de 9 cm de diámetro. Las placas contienen medio Nematode Growth Medium (NGM) agar (3 g/L NaCl, 2,5 g/L peptona, 17 g/L agar, 5 µg/L colesterol, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂ y 25 mM buffer fosfato pH 6) con un césped de la cepa de *E. coli* OP50¹³⁹ como alimento. La cepa OP50 es auxótrofa para uracilo, lo cual evita el sobrecrecimiento de la bacteria ya que el uracilo del medio es limitado.

Las larvas son sincronizadas por medio de tratamiento con solución de “bleaching” (1 M NaOH y 1% NaClO). Para esto se toman gusanos adultos grávidos y se exponen a dicha solución. La misma elimina todos los estadios del nematodo menos los embriones, protegidos por la envoltura. Luego de sucesivos lavados, los embriones son incubados “over night” en buffer M9 (3 g KH₂PO₄; 6 g Na₂HPO₄; 5 g NaCl; 1 mL 1 M MgSO₄; H₂O csp. 1 L). Al día siguiente son contados y colocados en placas de petri con NGM (4.000 larvas L1 por placa)¹³⁹. Cabe mencionar que luego de esta sincronización todas las L1 contienen exactamente 550 células. El *bleaching* puede ser también utilizado para limpiar algún cultivo de gusanos eventualmente contaminado. Después de 48 horas, las larvas alcanzan el estadio L4, el cual es el utilizado en el ensayo de motilidad.

3.2.3 Ensayo de motilidad de *C. elegans*

Luego de llegar al estadio L4, los gusanos son lavados 3 veces y recuperados en K salino (32mM KCl; 51mM NaCl) conteniendo 0.015% de BSA en el último lavado. Posteriormente se colocan en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano; aproximadamente unos 60 gusanos por pocillo. Se agregan las drogas o extractos a probar, utilizándose una concentración final de 1% de DMSO en un volumen final de 100 µL. La placa se coloca en el sistema WMicrotracker, el cual mide por medio de haces infrarrojos la motilidad de los gusanos¹³⁷. Los primeros 15 minutos de mediciones se utilizan para normalizar el 100% inicial

de movimiento. El ensayo tiene una duración total de 18 horas en el cual se realizan medidas cada 15 minutos.

Los ensayos de la librería de NatureBank y Pathogen Box fueron realizados en duplicado, en placas diferentes. Para los compuestos de la librería LIDENSA se realizaron réplicas de todos aquellos que afectaron la motilidad aún de forma moderada. Para todos los extractos o compuestos que fueron activos se realizaron curvas dosis respuesta con 4 réplicas.

3.2.4 Ensayo de *Haemonchus* spp.

Larvas L3 de *Haemonchus* spp., gentilmente provistas por la Dra. Laura Domínguez, fueron incubadas junto a cada una de las 7 fracciones positivas por 24 horas. Los gusanos fueron evaluados mediante observación bajo la lupa a tiempo final.

3.2.5 Ensayo de toxicidad en zebrafish

Para la generación de las larvas a utilizar en el ensayo se colocan, la noche anterior a la reproducción, dos machos y dos hembras adultos en un mismo tanque. Los embriones son recolectados al día siguiente y mantenidos en placas de petri con medio E3 (5mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM Mg₂SO₄ y 0,0001% de azul de metileno) a 28°C. A las 96 horas post fertilización, las larvas de zebrafish son colocadas en placas de 96 pocillos (3 larvas por pocillo). Las mismas son incubadas por unas 24 horas adicionales. Los compuestos son agregados en un volumen final de 250 µL y una concentración final de 1% de DMSO. La viabilidad es determinada por presencia de latido del corazón mediante observación bajo lupa a las 24 horas del inicio del tratamiento^{140,141}.

3.2.6 Identificación de genes de nematodos a interferir

Los genes testeados fueron seleccionados utilizando la herramienta bioinformática BioMart (<https://parasite.wormbase.org/biomart/martview/>), eligiendo aquellos que *C. elegans* tiene en común con nemátodos parásitos (*Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Strongyloides papillosus*), pero no con vertebrados (humano y zebrafish). De esta forma se

buscó obtener blancos altamente selectivos. Los genes seleccionados se encuentran en la tabla anexa 1.

3.2.7 Ensayo de interferencia génica en *C. elegans*

Se coloca 1 mL de NGM agar al 6% en placas de 24 pocillos. Se agregan 20 gusanos en estadio L1, 10 μ L de cultivo de bacteria *E. coli* interferente (productora del ARNi) y 5 μ L de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). La cepa de *E. coli* utilizada para los ensayos de interferencia es HT115, deficiente en RNAsa III. Las bacterias interferentes portan el plásmido L4440, que contiene el promotor T7, inducible por IPTG, flanqueando el ADN que codifica para el ARN interferente; de esta manera se produce ARN de doble hebra por la bacteria, el cual es ingerido por el gusano. Los gusanos son cubiertos con 200 μ L de agar de pescado 7%, el cual tiene la ventaja de ser líquido a 30°C. A continuación se agrega una capa de 2 mL de NMG agar 6%. Sobre el agar se adicionan 20 μ L de cultivo de bacteria *E. coli* OP50 regular (Fig. 6).

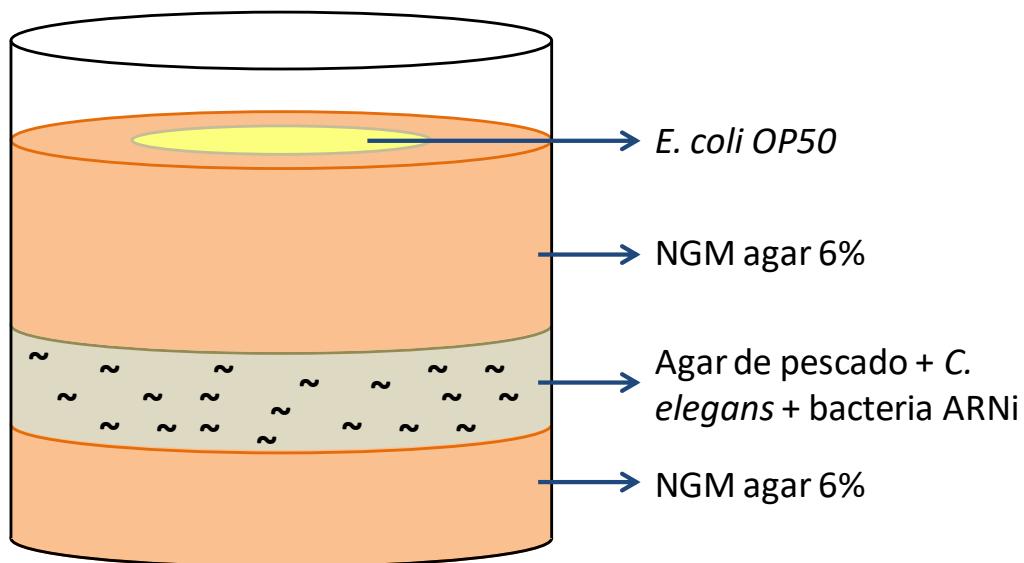


Figura 6: Esquema de un pocillo del ensayo de excavación e interferencia génica de *C. elegans* en placa de 24 pocillos.

De esta forma, los gusanos comenzarán a alimentarse con la bacteria interferente. Cuando ésta se agote intentarán alcanzar la superficie donde hay más bacteria presente. Aquellos gusanos que tengan afectada la expresión de un gen esencial o necesario para la excavación no serán capaces de alcanzar la superficie, lo que permite su identificación mediante observación bajo lupa luego de una semana.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE 1: BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS NEMATICIDAS DE LIBRERÍAS DE PRODUCTOS QUÍMICOS SINTÉTICOS

Los resultados de esta sección se encuentran contenidos en un manuscrito enviado a la revista *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. A modo de resumen: Para la búsqueda de compuestos nematicidas es necesario contar con un ensayo confiable que permita determinar la actividad de las moléculas a evaluar. Para esto se puso a punto un ensayo infrarrojo de motilidad con el nematodo modelo *C. elegans*. Como primera etapa de la puesta a punto se probaron diferentes concentraciones de dos nematicidas comerciales conocidos, la ivermectina y el levamisol. En una segunda etapa se realizó el cribado de la biblioteca química de acceso público "Pathogen Box", la cual contiene 400 compuestos. La misma había sido ya evaluada por un grupo de investigación independiente australiano en el nematodo parásito *H. contortus*. Interesantemente ambos trabajos determinaron la presencia de la misma única molécula activa, el *tolfenpyrad*.

Luego de validar el ensayo fenotípico, se procedió evaluando una biblioteca química de la cual no existía información de compuestos activos frente a nematodos. Esta biblioteca ensayada contiene 175 compuestos y fue desarrollada por Guzmán Álvarez y colaboradores del Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Centro Universitario Regional Litoral Norte de la Universidad de la República. Para esto se ensayaron 175 compuestos de una diversidad de familias químicas. Los compuestos más activos encontrados fueron aquellos con una conjugación de una insaturación con un átomo electronegativo (N, O o S) y un anillo aromático. Es de destacar la identificación de ariliden cetonas y aril hidracinas como nuevos nematicidas. Además, uno de estos compuestos, (1E,2E)-1,2-bis(tiofen-3-ilmtilen)hidracina, presentó actividad nematicida total a 25 μM , siendo inocuo frente al vertebrado modelo zebrafish a 50 μM .

Todos los resultados presentados en el artículo enviado para su publicación, que se adjunta a continuación, fueron obtenidos por mí durante el desarrollo de la tesis de Maestría.

Manuscript Details

Manuscript number IJPDDR_2018_168

Title *Caenorhabditis elegans* infrared-based motility assay identified new hits for nematicide drug development

Article type Full Length Article

Abstract

Nematode parasites have a profound impact on humankind: infect nearly a quarter of the world population as well as livestock and crops. There is an urgent and pressing need for discovering new nematicides due to the spread of resistance to currently used drugs. The free-living nematode *C. elegans* is a formidable model organism that offers key advantages to accelerate anthelmintic drug discovery. Notably, *C. elegans* is experimentally tractable and in contrast to host-derived parasites breeds easily in the laboratory. We report the screening of drug-like libraries using an overnight high-throughput *C. elegans* assay, based on an automated infrared motility reader. As a proof of concept we screened the "Pathogen Box" library. Tolfenpyrad, previously identified as anthelmintic against *Haemonchus contortus*, was also the single active compound against *C. elegans*. We then screened an in-house library containing a diversity of compound families. Most active compounds had conjugation of an unsaturation with an electronegative atom (N, O or S) and an aromatic ring. Importantly, we identified symmetric arylidene ketones and aryl hydrazine derivatives as novel nematicides. Furthermore, one of these compounds, (1E,2E)-1,2-bis(thiophen-3-ylmethylene)hydrazine, was active as nematicide at 25 μM , but innocuous to the vertebrate model zebrafish at 50 μM . Our results identified novel nematicidal scaffolds and illustrate the value of *C. elegans* in accelerating nematicide discovery using a non-labor intensive automated assay that provides a simple overnight readout.

Keywords Nematicide; nematode; anthelmintic; *C. elegans*; arylidene ketones; aryl hydrazine

Manuscript category Multicell

Corresponding Author Gustavo Salinas

Order of Authors Gaston Risi, Elena Aguilera, Enrique Lados, Gonzalo Suárez, Inés Carrera, Guzman Alvarez, Gustavo Salinas

***Caenorhabditis elegans* infrared-based motility assay identified
new hits for nematicide drug development.**

Gastón Risi^{1,2}, Elena Aguilera³, Enrique Ladós^{1,2}, Gonzalo Suárez⁴, Inés Carrera^{1,5}, Guzmán Álvarez^{3*}, Gustavo Salinas^{1,2*}

¹Worm Biology Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

³Laboratorio de Moléculas Bioactivas - CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

⁴Área Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

⁵Current address: Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Área Farmacología, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

*Corresponding Authors:

Biological aspects: Gustavo Salinas. Worm Biology Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, CP-11400, Montevideo, Uruguay. Telephone number: +598 25220910 ext 179. E-mail: gsalin@fq.edu.uy

Chemical aspects: Guzmán Álvarez. Laboratorio de Moléculas Bioactivas - CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Ruta 3 Km 363, CP-60000, Paysandú, Uruguay. Telephone number: Phone. +598 47227950 ext. 131
E-mail: guzmanalvarezlqo@gmail.com

Abstract

Nematode parasites have a profound impact on humankind: infect nearly a quarter of the world population as well as livestock and crops. There is an urgent and pressing need for discovering new nematocides due to the spread of resistance to currently used drugs. The free-living nematode *C. elegans* is a formidable model organism that offers key advantages to accelerate anthelmintic drug discovery. Notably, *C. elegans* is experimentally tractable and in contrast to host-derived parasites breeds easily in the laboratory. We report the screening of drug-like libraries using an overnight high-throughput *C. elegans* assay, based on an automated infrared motility reader. As a proof of concept we screened the "Pathogen Box" library. Tolfenpyrad, previously identified as anthelmintic against *Haemonchus contortus*, was also the single active compound against *C. elegans*. We then screened an in-house library containing a diversity of compound families. Most active compounds had conjugation of an unsaturation with an electronegative atom (N, O or S) and an aromatic ring. Importantly, we identified symmetric arylidene ketones and aryl hydrazine derivatives as novel nematocides. Furthermore, one of these compounds, (1*E*,2*E*)-1,2-bis(thiophen-3-ylmethylene)hydrazine, was active as nematocide at 25 μ M, but innocuous to the vertebrate model zebrafish at 50 μ M. Our results identified novel nematocidal scaffolds and illustrate the value of *C. elegans* in accelerating nematocide discovery using a non-labor intensive automated assay that provides a simple overnight readout.

Keywords: Nematocide; nematode; anthelmintic; *C. elegans*; arylidene ketones; aryl hydrazine

1. Introduction

Nematoda (commonly known as roundworms) is one of the largest phyla in the animal kingdom and includes free-living as well as parasitic species. Nematode parasites have a profound impact on humankind. Approximately one quarter of the world population harbor nematode infections, with the greatest prevalence in Africa, Asia and Latin America (Caffrey, 2012; Keiser and Utzinger, 2010; WHO, 2018a). Nematodes also infect livestock and crops, affecting food production (Caffrey, 2012). Resource-poor regions of the world suffer under an enormous burden of ill health, adverse social impact and economic loss caused by nematode infections (Lo et al., 2017).

Nematodes are the most common human parasites. Nearly one billion people are infected with *Ascaris lumbricoides*, the major cause of human geohelminthiasis, while several hundred million people are infected with other soil-transmitted nematodes, mainly whipworms such as *Trichuris trichiura* and hookworms such as *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenalis* (WHO, 2018a). These nematodes colonize the gut and often result in diarrhea and anaemia. Tissue-dwelling nematodes are less prevalent, but can cause serious illness. Lymphatic filariasis affects 120 million people worldwide and can result in gross disfiguration and enlargement of the lower limbs. Several million people are thought to be infected with *Onchocerca volvulus*, which can cause impaired sight leading to 'river blindness' (WHO, 2018b, 2018c). Nematodes are also the most common parasites of livestock (notably cattle and sheep, but also pig and horse) impacting on animal welfare and causing significant economic loss (Charlier et al., 2014). *Haemonchus contortus*, *Cooperia spp.* and *Ostertagia spp.* are the most prevalent parasitic worms in livestock and cause important

damages. Since thousands of *H. contortus* adult worms can infect a single host and each of them can remove up to 30 μL of blood per day, infection rapidly causes anaemia and consequent death. This parasite, with the shortest life cycle (20 days) of any gastrointestinal nematode, possesses an enormous biotic potential; each female worm lays 5,000 to 15,000 eggs per day (Emery et al., 2016).

Despite the magnitude of the health and socioeconomic problems caused by worm infections, there are few solutions. The first veterinary vaccine against a nematode (*H. contortus*) has recently been developed and commercially launched (BarberVax®), being currently under field-trial evaluation. The control of nematode infections has traditionally relied on chemotherapy. In livestock there is widespread resistance to most classes of nematicides (e.g. benzimidazoles, avermectins, levamisole) due to their indiscriminate use (Berk et al., 2016; Geary, 2005; Keiser and Utzinger, 2010; Ramünke et al., 2016; Sutherland and Leathwick, 2011). The emergence and spread of drug resistance is a threat for human nematode infections. Therefore, there is a pressing need for new nematicides. The shortage of new drugs is due to several reasons, among them the extraordinary success of ivermectin, an anthelmintic for which there is now widely reported resistance in livestock (Campbell, 2016; Geary, 2005). More fundamentally, research on parasitic worms received much less funding than other globally-important health issues (Hotez et al., 2008). There is low funding for research in poor countries, and pharmaceutical industries do not allocate resources due to the low profitability of investments in this field (Lo et al., 2017).

The lack of a convenient model to perform high-throughput screening (HTS) of chemical libraries is another obstacle for drug discovery because parasitic worms cannot be cultured without a host and phenotypic drug screens are labor intensive.

The model organism *C. elegans* is a free-living nematode that offers a great opportunity to be used as a 'model parasite' to accelerate drug discovery against nematodes (Burns et al., 2015; Keiser, 2015; Kotze et al., 2014). The experimental tractability of *C. elegans* and the solid scientific community around this model organism are some of the key advantages of this model. Although *C. elegans* is not a parasite, it is closely related to parasitic nematodes (Blaxter, 2011). Despite dissimilar lifestyles of free-living and parasitic species and genetic differences associated with parasitism (specific gene losses and gene family expansions associated with parasitism), *C. elegans* is as similar to parasitic worms as parasitic worms are to each other (International Helminth Genomes Consortium, 2018). Significantly, most nematicides kill *C. elegans*. Indeed, *C. elegans* has been instrumental in elucidating the mechanism of nematicidal activity and resistance (Holden-Dye and Walker, 2014). The molecular targets for the drugs that come out of screens can be defined using the powerful approach of forward genetics in *C. elegans* and may uncover new effectors for nematicidal activity. Recently, *C. elegans* was used in a screen of 67,012 compounds and the results were encouraging: more than half of the lethal compounds against *C. elegans* were also lethal against *H. contortus* and/or *Cooperia* spp. Also a small number of them was lethal to *Danio rerio* demonstrating the selectivity of this process (Burns et al., 2015). However, this

screening was time consuming and required visualization and image processing.

Different *C. elegans* assays have been developed for nematicide discovery, particularly using behavioral and metabolic readouts. Colorimetric and fluorescence-based assays have been reported for metabolism analysis (Ferreira et al., 2015; James and Davey, 2007). Regarding behavior, the range of approaches is broader. The usage of a scanner to identify decreased motility has been reported (Mathew et al., 2016). There are numerous automatic systems to analyze behavior changes, including worm tracking by beam interruption or camera displays, targeting specific or general behavior, microfluidics, among others (Buckingham et al., 2014).

Progress in drug discovery also relies on high quality chemical libraries that can be used for HTS as a basis for subsequent research. These libraries do not abound. One such curated library is 'Pathogen Box', which contains 400 diverse drug-like compounds, which is provided freely to research labs to boost drug discovery, share results and perform cross-laboratory validation of hits. Using this library a single compound, tolfenpyrad, was recently found to be active against the nematode parasite *H. contortus* using a laborious manual screen (Preston et al., 2016).

In the present study we describe an overnight standardized and automated HTS motility assay using the free-living nematode *C. elegans*. As a proof of concept we screened the 'Pathogen Box' library. The single nematicide identified in our screening was tolfenpyrad, cross-validating this hit. We also screened 175 compounds from our in-house library (LIDENSA Chemolibrary) and identified

novel scaffolds for nematicide drug development. We validate an extremely simple and reliable HTS method using locomotion as a readout to search for nematicides that takes advantage of the free-living model organism *C. elegans*.

2. Methods

2.1 Chemicals

Levamisole and ivermectin were obtained from Compañía Cibeles S.A. (Montevideo, Uruguay). Pathogen Box was kindly provided by Medicines for Malaria Venture, Pathogen Box plates were maintained at -20°C until use. The second compound library (LIDENSA Chemolibrary) utilized in this study was previously synthesized as part of our ongoing program in drug development for Chagas disease and other human maladies. This library contains, to date, more than 2000 compounds (Aguilera et al., 2016; Álvarez et al., 2017, 2015, 2014; Cerecetto and González, 2008). We selected 60 compounds with antiparasitic activity (against *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania spp.* and *Fasciola hepatica*), as well as compounds randomly selected, representing all the chemical families present in our chemolibrary. The random selection of the other 115 compounds was performed based on several criteria: abundance of the compound, solubility, cost-effective synthetic procedures, and toxicology data. The structural details of the selected molecules are in **Table S1**. All other reagents used in this work were from SIGMA Chemical Company.

2.2 *C. elegans*, strains and culture methods

The wild-type *C. elegans* Bristol strain N2 and *Escherichia coli* (*E. coli*) OP50 strain were obtained from the Caenorhabditis Genomics Center (Minneapolis, MN, USA). Worms were maintained under standard conditions at

20°C on Nematode Growth Media (NGM) agar plates seeded with *E. coli* OP50 as a source of food. The wild-type *C. elegans* Bristol strain N2 was cultured and maintained according to the procedures described previously (Brenner, 1974).

2.3 Assessment of *C. elegans* motility using WMicrotracker ONE

The method used to assess motility is described in detail in (Simonetta and Golombek, 2007). Briefly, the locomotor activity recording system, WMicrotracker™ ONE (PhylumTech), detects infrared microbeam interruptions (**Fig. 1**). When worms move across the light beam, a transient fluctuation in the signal received by the phototransistor is generated and movement detected by digital analysis of the phototransistor output. Synchronized L4 *C. elegans* worms were removed from culture plates and washed three times with K saline (NaCl 51 mM, KCl 32 mM) by centrifugation at 1000 g. Worms were plated in 96-well flat microtiter plates (Costar). Approximately 60 worms per well were seeded in 80 µL of K saline containing 0.015% BSA and their basal movement was measured for 30 minutes to normalize the 100% movement activity for each well at the beginning of the assay. Then, the drugs were added to a final volume of 100 µL per well. Dose-dependent assay for ivermectin was carried out in the 0.01-10 µM range in 1% DMSO. The levamisole dose-response assay concentration range was 1-1000 µM. No DMSO was used in the levamisole assays. The motility using WMicrotracker™ ONE was measured for 90 minutes.

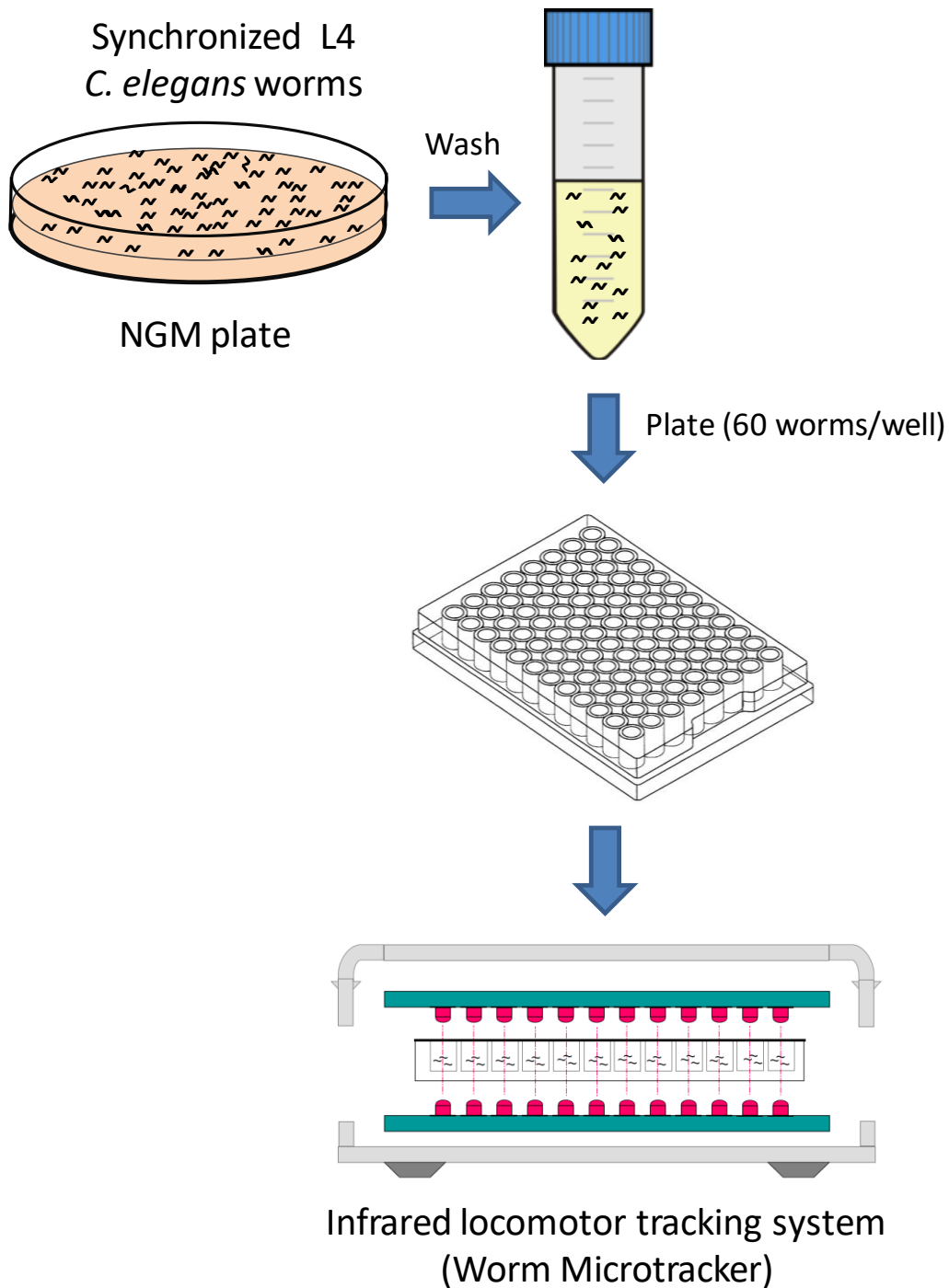


Fig. 1. *C. elegans* motility screen. The motility-based screening is based on an infrared detection system (WMicrotracker™ ONE, Phylumtech). An infrared system within the equipment measures *C. elegans* movement in microtiter plates. This allows to identify molecules that affect worm movement. The scheme of WMicrotracker™ ONE was kindly provided by Phylumtech.

2.4 Pharmacodynamic function

The half maximal effective concentrations (EC50) of ivermectin, levamisole, tolfenpyrad and compound 1381 were calculated using the GraphPad Prism software (GraphPad Prism, version 7.00 for Windows, San Diego, California, USA, www.graphpad.com) fitting a dose-response sigmoid curve.

2.5 Screening of compound libraries

Following the protocol described above, Pathogen Box compounds were added at a 50 μM final concentration and 1% DMSO in a final volume of 100 μL per well. Control wells with vehicle only were assayed by octuplicate. The motility using WMicrotracker™ ONE was measured during 17.5 hours. Putative positives were rescreened using the same method. The dose-dependent motility response for tolfenpyrad was carried out in the 2-30 μM range in 1% DMSO. The compounds of the LIDENSA Chemolibrary were initially tested at 50 μM (or at a lower concentration if insoluble or limited in quantity, see **Table S1**). Putative positives were rescreened. The dose-dependent motility response for 1381 was carried out in the 5-50 μM range in 1% DMSO. Tolfenpyrad and 1381 toxicity at 50 μM against all developmental stages of *C. elegans* was assessed by stereoscopic microscope observation of larval and adult worms after overnight treatment at 20° C. Lethality was determined as absence of movement at 24 hours, absence of response to a gentle touch with a sterilized platinum wire, and further assessed by absence of offspring.

2.6 In vivo toxicity on zebrafish (*Danio rerio*) larvae

Two zebrafish adult males and females were placed the night before spawning in breeding tanks to let them cross using glass marbles as spawning substrate.

Collected fertilized eggs were maintained in Petri dishes with E3 embryo medium (5mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM Mg₂SO₄ and 0.0001% methylene blue) at 28 °C. 72 h post fertilization, zebrafish embryos were placed in 96-well plates (3 embryos per well, 6 wells per condition) containing 225 µl of E3 medium and incubated for additional 24 h at 28°C. Compounds were tested at 5-50 µM concentration in a total 250 µl/well volume. DMSO at a 1 % final concentration was used to avoid compound precipitation. Viability was assessed by presence of heartbeat under stereoscopic microscope observation after 24 h treatment (Álvarez et al., 2017).

2.7 Ethics Statement

Zebrafish embryos used in this work were under 120 hours post fertilization. Therefore, according to Uruguayan legislation and National Honorary Committee for Animal Experimentation (CHEA) guidelines, there is no requirement for ethical protocol approval.

3. Results

Different conditions were initially tested to obtain an optimal *C. elegans* motility response. A linear correlation between worm number and motility was observed between 30-90 worms (data not shown). The addition of BSA was found to reduce binding of worms to the plastic surface and 1% DMSO (used as compound vehicle) did not affect *C. elegans* motility. Initially we tested two commercially available nematicides, ivermectin and levamisole, known to kill worms by paralysis through different mechanisms (reviewed in (Holden-Dye and Walker, 2014)). The dose-response curves obtained for both compounds (**Fig. 2**) clearly showed that the assay is suitable for screening drugs that affect

motility. The EC50 was $0.19 \pm 0.01 \mu\text{M}$ for ivermectin and $6.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ for levamisole.

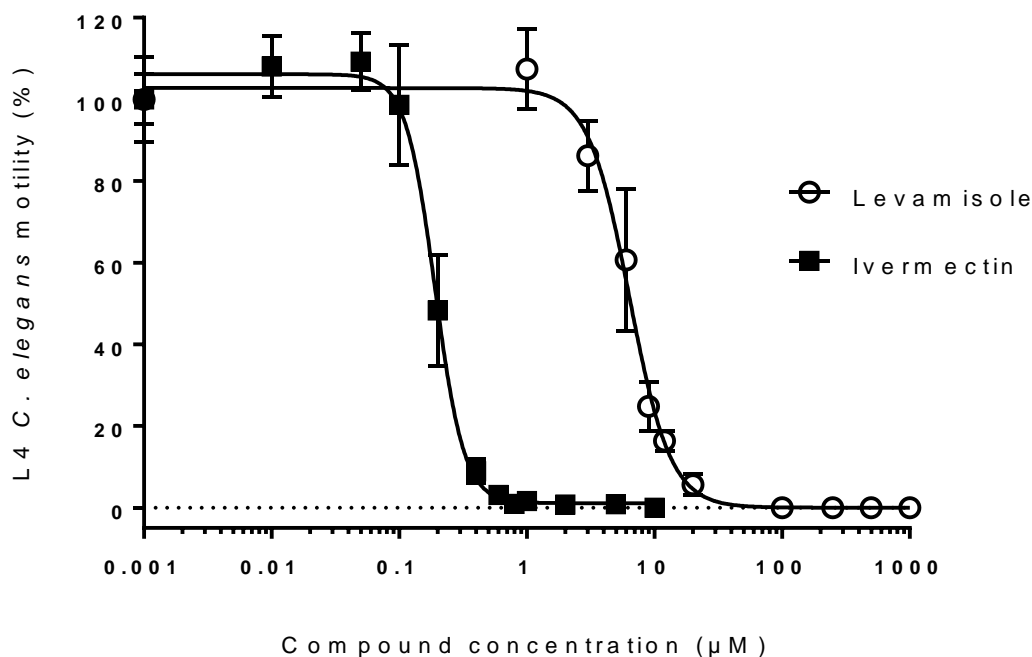


Fig. 2. Ivermectin and levamisole effects on *C. elegans* motility. 90 min Ivermectin (filled squares) and levamisole (open circles) dose–response motility assay of *C. elegans* L4 larvae. The worms were incubated in K saline containing 0.015% BSA, 1% DMSO. Ivermectin was examined at the 0.01 - 10 μM range and levamisole at 1 - 1000 μM range. EC50 for ivermectin and levamisole were $0.19 \pm 0.01 \mu\text{M}$ and $6.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$, respectively. Error bars correspond to standard deviations.

Since after 20 hours *C. elegans* motility started to decrease; the end point of the assay was set at 17.5 hours for screening purposes. As a proof of concept of the assay, we performed the screen of Pathogen Box, a library which contains 400 diverse drug-like compounds, previously screened for nematicides using *Haemonchus contortus*. This screen resulted in the identification of tolfenpyrad (Compound ID: MMV688934; pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10110536) as the single active compound present in the library (**Fig. 3a**). Tolfenpyrad was the single compound identified when this library was screened using *H.*

contortus L3 and L4 larval stages. The dose-response curve showed that tolfenpyrad was fully active at a concentration as low as 10 μM (**Fig. 3b**), with an EC50 of $3.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$. The worms treated with tolfenpyrad were then examined under the stereoscopic microscope and a clear lethal phenotype was observed (**Fig. 3c and 3d**). Furthermore, treated L4 did not develop into adult worms, confirming the lethal phenotype.

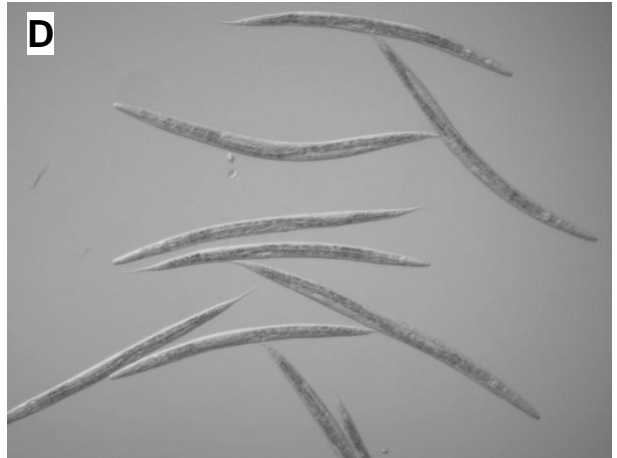
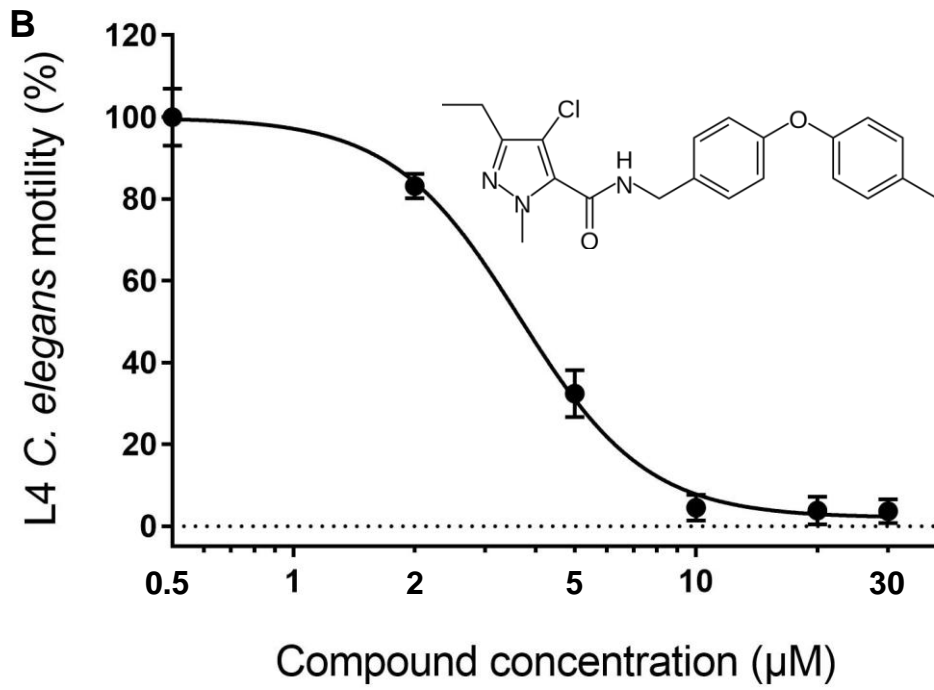
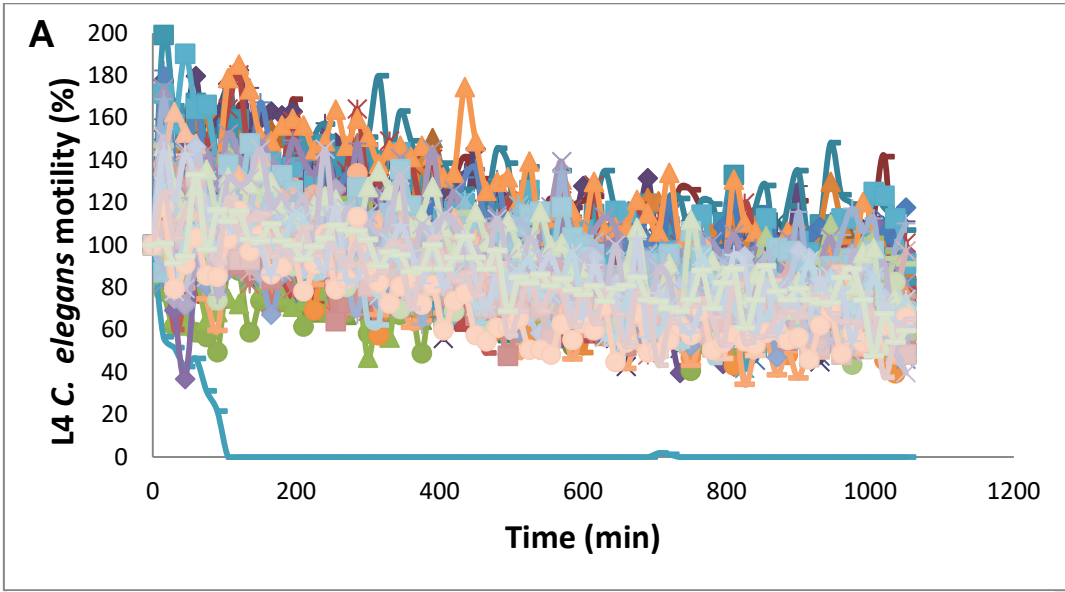


Fig. 3. Pathogen Box screen using *C. elegans*. Panel A. Motility assay of fourth-stage larvae (L4) of *C. elegans* incubated at 50 μM concentration of each compound in K saline, containing 0.015% BSA and 1% DMSO. Each curve represents the movement of the worms in every well containing a single compound. The blue curve at the bottom is tolfenpyrad, the single hit found in the screening. A single plate is shown. **Panel B.** Overnight (17.5 h) tolfenpyrad dose–response motility assay of L4 *C. elegans* larvae. The worms were incubated in K saline containing 0.015% BSA, 1% DMSO and tolfenpyrad at the 2 - 30 μM range. The EC₅₀ was $3.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$. Error bars correspond to standard deviations. Eight replicates were performed for each concentration. **Panels C and D.** Effect of tolfenpyrad on *C. elegans*. Fourth-stage larvae (L4) *C. elegans* worms were incubated with vehicle (Panel C) or with tolfenpyrad at 50 μM (Panel D) during 18 h. Scale Bar: 500 μm .

In order to identify new nematicides, we screened 175 compounds from our in-house library (**Table S1**). This screening led to the identification of 28 compounds with mild to potent nematicide activity (Table 1), using an arbitrary threshold. We considered mild activity a remaining motility of 25-65%, and potent activity a remaining motility of 0-25%. Three of the most active compounds (chemolibrary codes 795, 796 and 1245) are symmetric arylidene ketones. Two additional potent compounds were aryl hydrazine derivatives 1381 and 1140. The chalcone 731 was also identified as potent.

The most active compounds, 795, 796 and 1381, were then assayed at 5, 25 and 50 μM (**Fig. 4a**), being compound 1381 the most paralyzing. Although motility did not reach zero at the highest concentration assayed ($\approx 5\%$ motility), absence of movement at 24 hours was observed. Furthermore, treated L4 did not develop into adult worms. Then we examined these molecules at 5, 25 and 50 μM against zebrafish larvae, as a vertebrate model (**Fig. 4b**). Compound **1381** was active as nematicide at 25 μM , but it did not exert any viability effect on zebrafish at 50 μM , being insoluble above this concentration. For this

compound the dose response was made yielding an EC50 of $19.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ (Fig. 5).

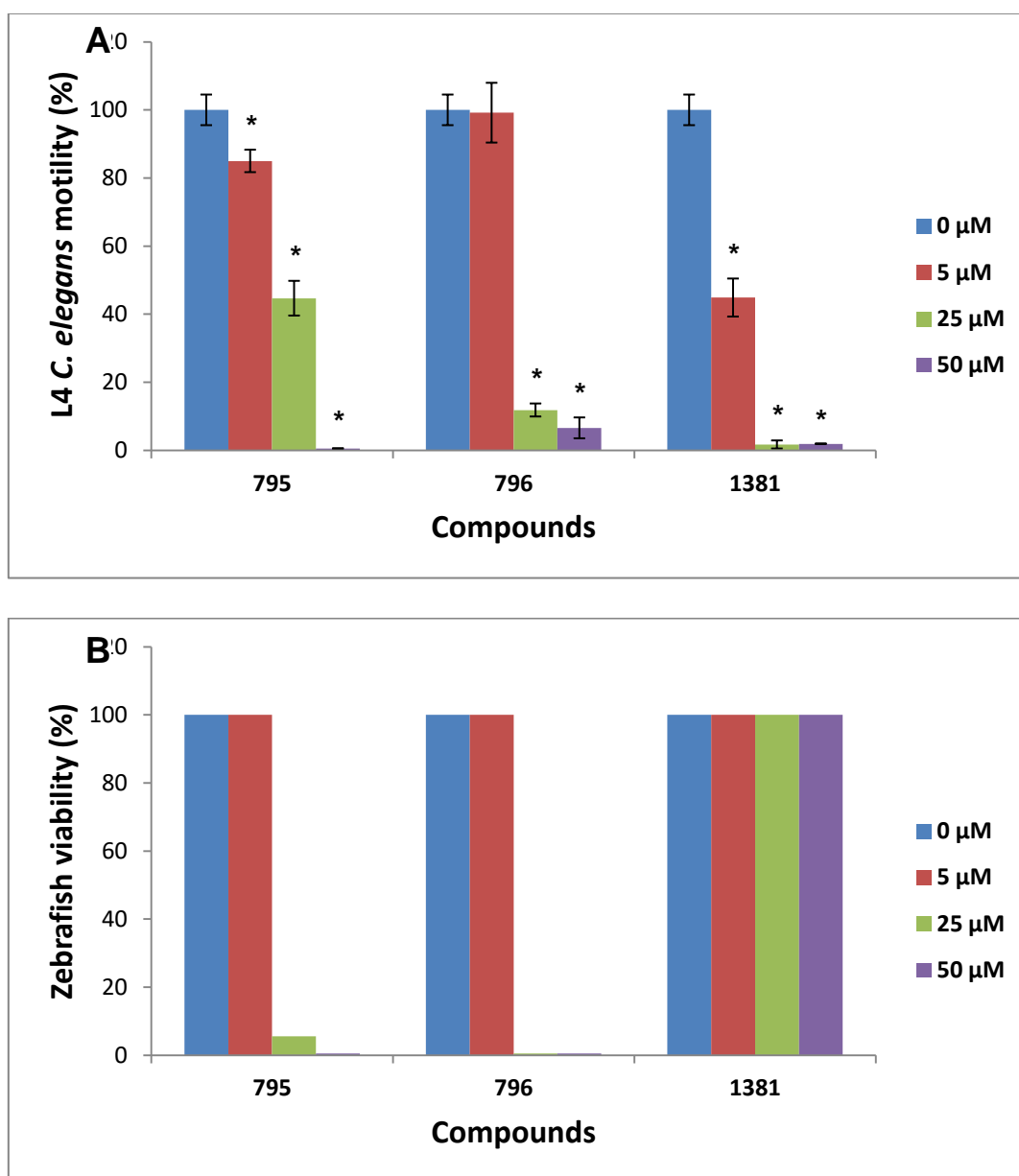


Fig. 4. Chemolibrary compounds codes 795, 796 and 1381 effects on *C.elegans* motility and toxicity in zebrafish. Panel A. 795, 796 and 1381 were tested at 5, 25 and 50 μM against fourth-stage larvae (L4) of *C. elegans* for 18 hours. The worms were incubated in K saline containing 0.015% BSA, 1% DMSO and the compounds at different concentrations. Asterisks indicate a significant difference from the control value (* $p \leq 0.01$ by unpaired t test). Six replicates were performed per condition. **Panel B.** 795, 796 and 1381 were tested at 5, 25 and 50 μM against 96 hours post fertilization zebrafish larvae for 24 hours. 18 zebrafish embryos per condition were incubated in E3

embryo medium at the different compound concentrations. Viability was assessed by presence of heartbeat under stereoscopic microscope observation after the 24 hours treatment.

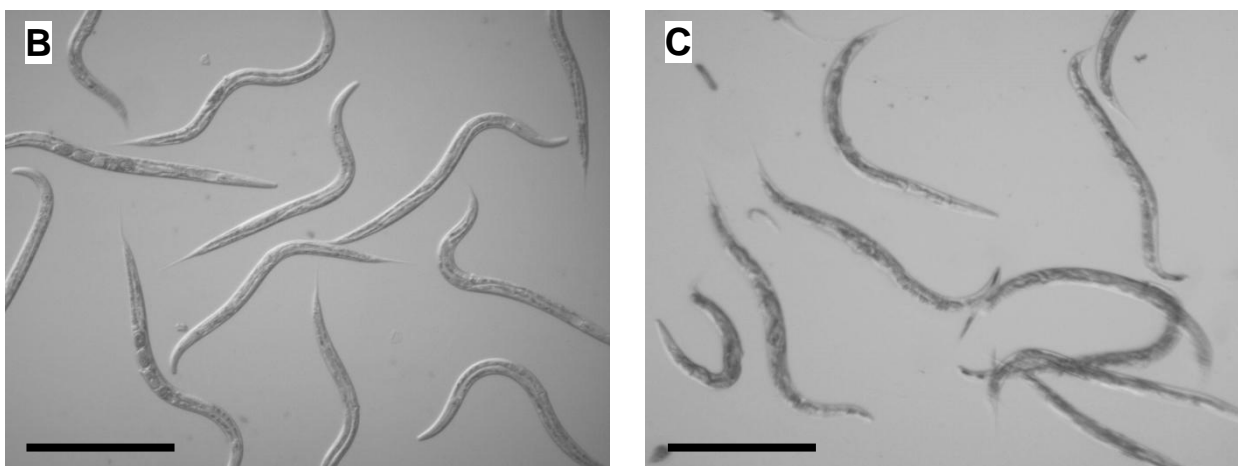
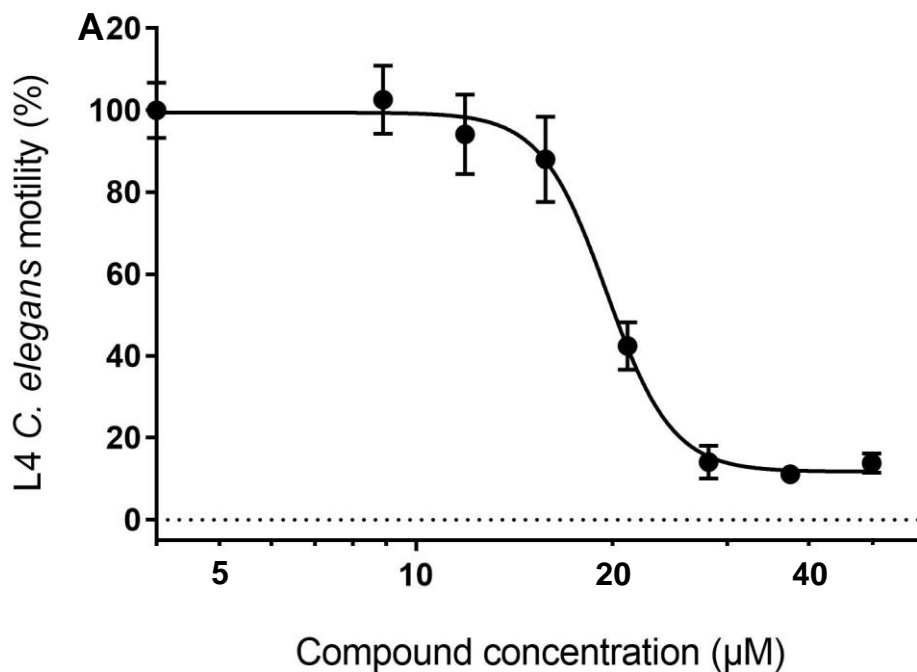


Fig. 5. Chemolibrary compound code 1381 effect on *C. elegans* motility. Panel A. 18 hours 1381 dose–response motility assay of fourth-stage larvae (L4) of *C. elegans*. The worms were incubated in K saline containing 0.015% BSA, 1% DMSO and 1381 at different concentrations (range 8 – 50 µM). EC50 of 19.6 ± 0.4 µM. **Panels B and C.** Effect of 1381 on *C. elegans*. Fourth-stage larvae (L4) *C. elegans* worms were incubated with vehicle (Panel B) or with 1381 at 50 µM (Panel C) during 18 h. Scale Bar: 500 µm.

4. Discussion

In this study we describe a whole-organism screening for nematicides using the model organism *C. elegans*. Most screens for anthelmintic discovery rely on target-based approaches. However, this approach is most adequate for optimizing a hit. Instead, whole organism-based screenings are powerful for identifying new hits. To this end, nematode parasites have been used, but they have limitations for large scale screenings since require a continuous and homogeneous source of host-derived parasites. *C. elegans* is a free-living nematode and a model organism which has recently been established as an effective cost-efficient model system for anthelmintic drug discovery (Burns et al., 2015). The method used in this study, however, required microscopy examination of each well after five days of liquid culture. Since most known anthelmintics affect motility, we thought that WMicrotracker™ ONE would offer a convenient method because it allows locomotion of *C. elegans* to be monitored and quantified automatically on microtiter plates (Simonetta and Golombek, 2007). In particular this motility assay is non-labor intensive and the read out does not require additional processing.

We first standardized the assay and proved that it provided a clear readout with two commercial nematicides known to affect motility. Indeed, reproducible dose-response curves were obtained for levamisole and ivermectin. For fully validating the method we screened a curated library of compounds that has already been tested for anthelmintic activity. Pathogen box was an ideal medium-sized chemical library that has recently been tested using the nematode parasite *H. contortus* (Preston et al., 2016). Importantly, *C. elegans* and *H. contortus* screens resulted in the identification of a single molecule

present in Pathogen box: the approved pesticide tolfenpyrad. In contrast to the method used in the study by Preston et al. that required video recording and processing (Preston et al., 2016), the method used in this study has an automatic and simple overnight read out. The results cross-validate tolfenpyrad as the single nematicide present in Pathogen Box. This highlights the importance of using publicly available curated chemical libraries for generating consistent results, and more generally to repurpose existing drugs.

We then challenged the method with 175 compounds from our in house chemolibrary. Interestingly, of the active molecules against eukaryotic parasites (60), 19 (32%) were active against *C. elegans*. In contrast, of the other 115 compounds selected from the library, only 9 (8%) had nematicidal activity.

Seven different compound families were active (**Fig. 6**): arylidene ketones (8 out of the 27 compounds examined of this family), hydrazine (2 out of 4), thiazolidenehydrazine (7 out of 37) thiadiazoles (1 out of 5), carbazides (4 out of 26), esteroids (2 out of 22), chalcones (2 out of 10). Interestingly, from the 27 arylidene ketones the most potent family against *T. cruzi* was also the most potent in this screening (Aguilera et al., 2016). Inactive families in this screening were quinoxaline (7), indazoles (18), furoxanes (6) and triazines (3). Among the active molecules we observed a repeated pattern: conjugation of an unsaturation (one or two double bonds) with an electronegative atom in the center of the molecule (N, O or S) and an aromatic ring (**Fig. 6**, center). This pattern is in 26 out of the 28 active molecules, indicating that this type of structure constitutes a scaffold for future optimization. It is also important to highlight that 5 out of the 6 most potent nematicides are symmetric with 5-atoms

aromatic heterocycles as substituents.

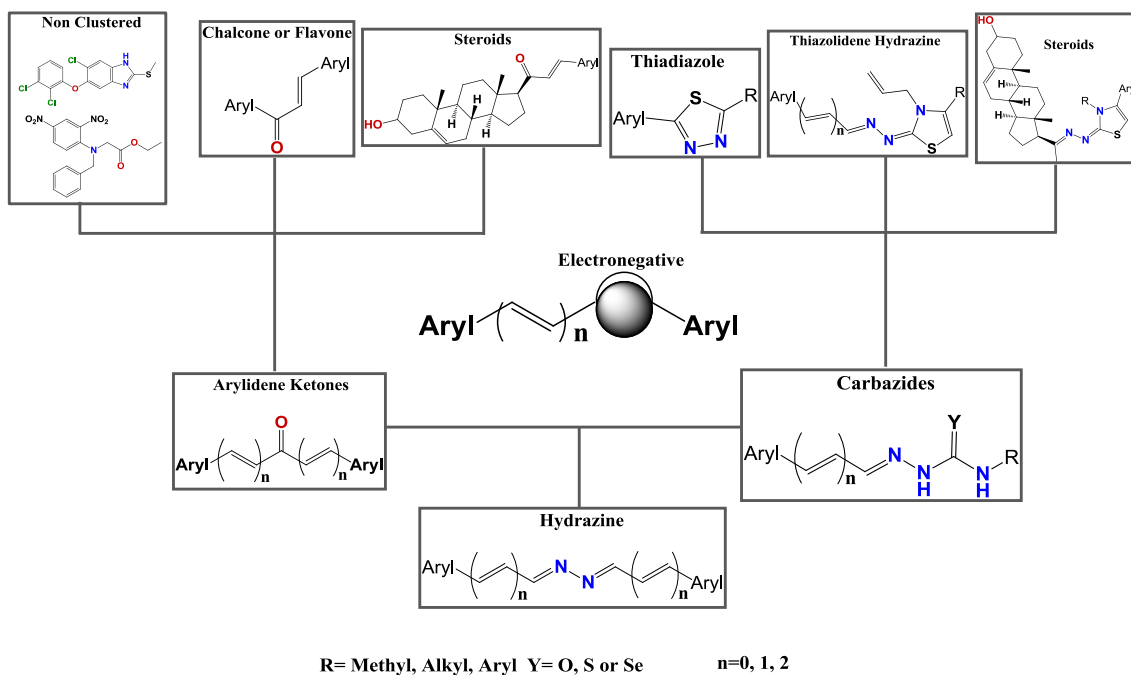


Fig. 6. Scaffolds of active families.

One of the most active compounds (chemolibrary code 796) is in the preclinical phase of drug development for Chagas disease, leishmaniasis and sleeping sickness. Five out of 6 potent molecules (795, 796, 1140, 1245 and 1381) have never been identified as nematicides, providing new scaffolds for rational drug design with increased efficacy. Compound 1381 is particularly promising: it is the most potent against *C. elegans* and innocuous towards zebrafish and it has a simple and low-cost synthesis. It will be relevant to test this molecule on a parasite nematode in future studies.

The advantages of *C. elegans* as a model organism have not been fully exploited in nematicide discovery. The *C. elegans* infrared method used in this study offers simplicity, reproducibility and machine reliability, accelerating nematicide discovery. It provides a non-labor intensive automated assay with a

simple overnight readout, which allows screening of thousands of compounds per day.

Acknowledgements

N2 *C. elegans* and OP50 bacterial strains were kindly provided by the Caenorhabditis Genetics Center (CGC). This work was supported by FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund, [COF 03/11]) G.R. was recipient of postgraduate study fellowships from Agencia Nacional de Innovación e Investigación [POS_NAC_2015_1_109854] and I.C was recipient of a posdoctoral fellowship from Agencia Nacional de Innovación e Investigación [PD_NAC_2013_11008].

References

- Aguilera, E., Varela, J., Birriel, E., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., de Bilbao, N.V., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Díaz Mazariegos, S., de Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Minini, L., Merlino, A., Cerecetto, H., González, M., Alvarez, G., 2016. Potent and Selective Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase with Concomitant Inhibition of Cruzipain: Inhibition of Parasite Growth through Multitarget Activity. *ChemMedChem* 11, 1328–1338. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500385>
- Álvarez, G., Martínez, J., Varela, J., Birriel, E., Cruces, E., Gabay, M., Leal, S.M., Escobar, P., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Yaluff, G., Torres, S., Serna, E., Vera de Bilbao, N., González, M., Cerecetto, H., 2015. Development of bis-thiazoles as inhibitors of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. Identification of new non-mutagenic agents that are active in vivo. *Eur. J. Med. Chem.* 100, 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.018>
- Álvarez, G., Perdomo, C., Coronel, C., Aguilera, E., Varela, J., Aparicio, G., Zolessi, F., Cabrera, N., Vega, C., Rolón, M., Rojas de Arias, A., Pérez-Montfort, R., Cerecetto, H., González, M., 2017. Multi-Anti-Parasitic Activity of Arylidene Ketones and Thiazolidene Hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Molecules* 22, 709. <https://doi.org/10.3390/molecules22050709>
- Álvarez, G., Varela, J., Márquez, P., Gabay, M., Arias Rivas, C.E., Cuchilla, K., Echeverría, G.A., Piro, O.E., Chorilli, M., Leal, S.M., Escobar, P., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Vera de Bilbao, N.I., González, M., Cerecetto, H., 2014. Optimization of

Antitrypanosomatid Agents: Identification of Nonmutagenic Drug Candidates with
in Vivo Activity. *J. Med. Chem.* 57, 3984–3999.
<https://doi.org/10.1021/jm500018m>

Berk, Z., Laurenson, Y.C.S.M., Forbes, A.B., Kyriazakis, I., 2016. Modelling the
consequences of targeted selective treatment strategies on performance and
emergence of anthelmintic resistance amongst grazing calves. *Int. J. Parasitol.*
Drugs Drug Resist. 6, 258–271. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.11.002>

Blaxter, M., 2011. Nematodes: The Worm and Its Relatives. *PLoS Biol.* 9, e1001050.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001050>

Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.

Buckingham, S.D., Partridge, F.A., Sattelle, D.B., 2014. 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, 226–32.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.10.004>

Burns, A.R., Luciani, G.M., Musso, G., Bagg, R., Yeo, M., Zhang, Y., Rajendran, L., Glavin,
J., Hunter, R., Redman, E., Stasiuk, S., Schertzberg, M., Angus McQuibban, G.,
Caffrey, C.R., Cutler, S.R., Tyers, M., Giaever, G., Nislow, C., Fraser, A.G., MacRae,
C.A., Gilleard, J., Roy, P.J., 2015. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for
anthelmintic discovery. *Nat. Commun.* 6, 1–11.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8485>

Caffrey, C.R., 2012. Parasitic helminths : targets, screens, drugs and vaccines. Wiley-
VCH.

- Campbell, W.C., 2016. Lessons from the History of Ivermectin and Other Antiparasitic Agents. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111209>
- Cerecetto, H., González, M., 2008. Anti-T. cruzi agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. *Mini Rev. Med. Chem.* 8, 1355–83.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., Vercruysse, J., 2014. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol.* 30, 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.009>
- Drwal, M.N., Banerjee, P., Dunkel, M., Wettig, M.R., Preissner, R., 2014. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res.* 42, W53-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gku401>
- Emery, D.L., Hunt, P.W., Le Jambre, L.F., 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int. J. Parasitol.* 46, 755–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>
- Ferreira, S.R., Mendes, T.A.O., Bueno, L.L., De Araújo, J.V., Bartholomeu, D.C., Fujiwara, R.T., 2015. A new methodology for evaluation of nematode viability. *Biomed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/879263>
- Geary, T., 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol.* 21, 530–532. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.014>
- Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2014. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1–29.

<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.143.2>

Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., Jacobson, J., 2008.

Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J. Clin. Invest.* 118, 1311–21. <https://doi.org/10.1172/JCI34261>

International Helminth Genomes Consortium, 2018. Comparative genomics of the

major parasitic worms. *Nat. Genet.* 1. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0262-1>

James, C.E., Davey, M.W., 2007. A rapid colorimetric assay for the quantitation of the

viability of free-living larvae of nematodes in vitro. *Parasitol. Res.* 101, 975–980. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0572-1>

Keiser, J., 2015. Is *Caenorhabditis elegans* the Magic Bullet for Anthelmintic Drug

Discovery? *Trends Parasitol.* 31, 455–456. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.004>

Keiser, J., Utzinger, J., 2010. The Drugs We Have and the Drugs We Need Against Major

Helminth Infections, in: *Advances in Parasitology.* pp. 197–230. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(10\)73008-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(10)73008-6)

Kotze, A.C., Hunt, P.W., Skuce, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Martin, R.J., Sager,

H., Krücken, J., Hodgkinson, J., Lespine, A., Jex, A.R., Gilleard, J.S., Beech, R.N., Wolstenholme, A.J., Demeler, J., Robertson, A.P., Charvet, C.L., Neveu, C., Kaminsky, R., Rufener, L., Alberich, M., Menez, C., Prichard, R.K., 2014. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 164–184.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.07.007>

Lo, N.C., Addiss, D.G., Hotez, P.J., King, C.H., Stothard, J.R., Evans, D.S., Colley, D.G., Lin, W., Coulibaly, J.T., Bustinduy, A.L., Raso, G., Bendavid, E., Bogoch, I.I., Fenwick, A., Savioli, L., Molyneux, D., Utzinger, J., Andrews, J.R., 2017. A call to strengthen the global strategy against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: the time is now. *Lancet Infect. Dis.* 17, e64–e69. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30535-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30535-7)

Mathew, M.D., Mathew, N.D., Miller, A., Simpson, M., Au, V., Garland, S., Gestin, M., Edgley, M.L., Flibotte, S., Balgi, A., Chiang, J., Giaever, G., Dean, P., Tung, A., Roberge, M., Roskelley, C., Forge, T., Nislow, C., Moerman, D., 2016. Using *C. elegans* Forward and Reverse Genetics to Identify New Compounds with Anthelmintic Activity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0005058. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005058>

Preston, S., Jiao, Y., Jabbar, A., McGee, S.L., Laleu, B., Willis, P., Wells, T.N.C., Gasser, R.B., 2016. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.07.004>

Ramünke, S., Melville, L., Rinaldi, L., Hertzberg, H., de Waal, T., von Samson-Himmelstjerna, G., Cringoli, G., Mavrot, F., Skuce, P., Krücken, J., Demeler, J., 2016. Benzimidazole resistance survey for *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* in three European countries using pyrosequencing including the development of new assays for *Trichostrongylus*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.10.002>

Simonetta, S.H., Golombek, D.A., 2007. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J. Neurosci. Methods* 161, 273–280.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.11.015>

Sutherland, I.A., Leathwick, D.M., 2011. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol.* 27, 176–181.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.11.008>

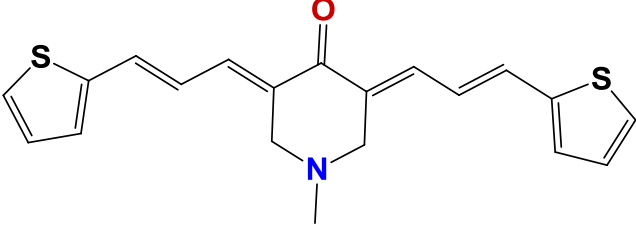
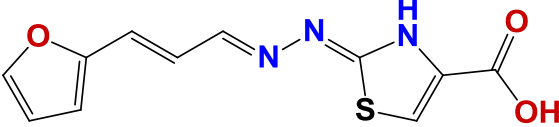
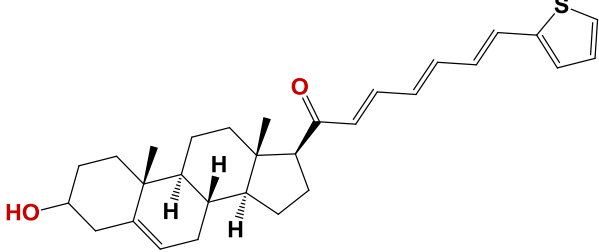
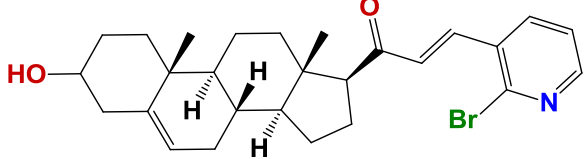
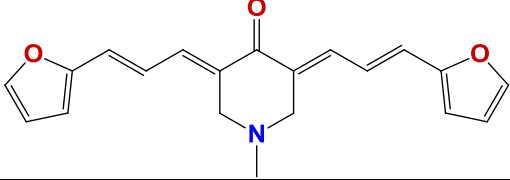
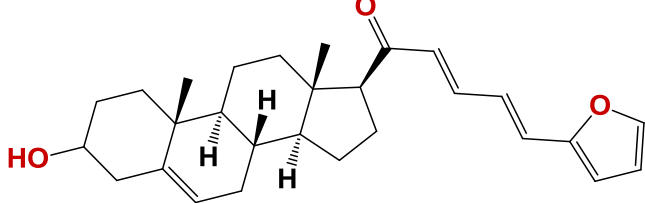
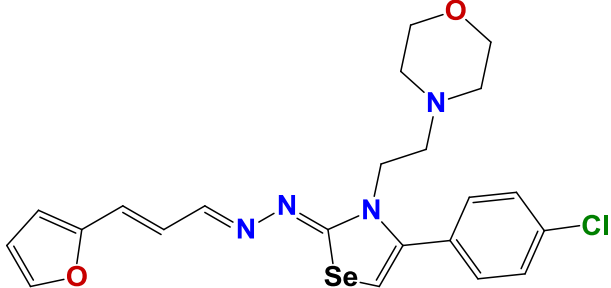
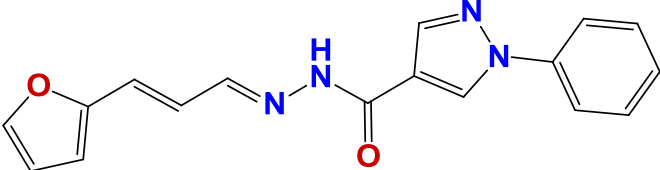
WHO, 2018a. Soil-transmitted helminth infections [WWW Document]. URL <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>

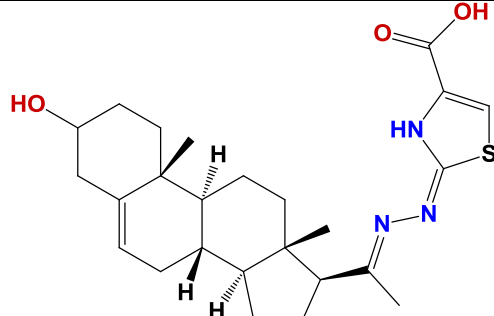
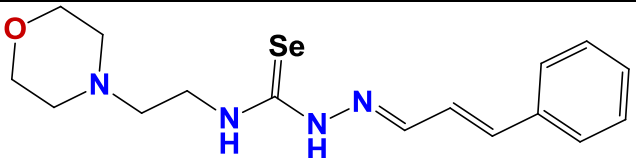
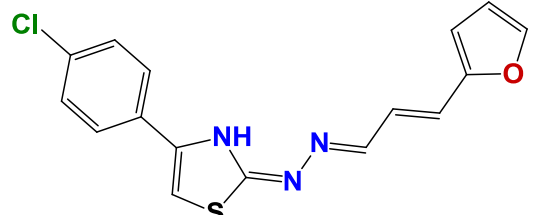
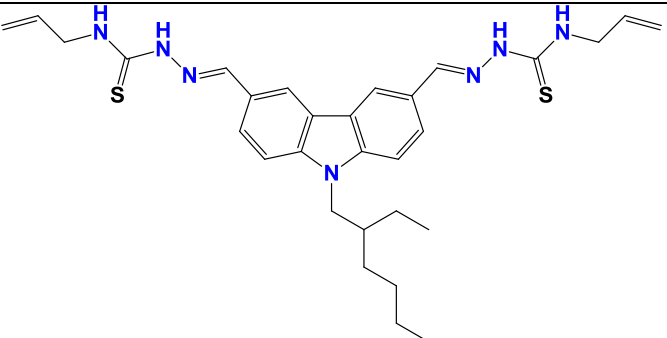
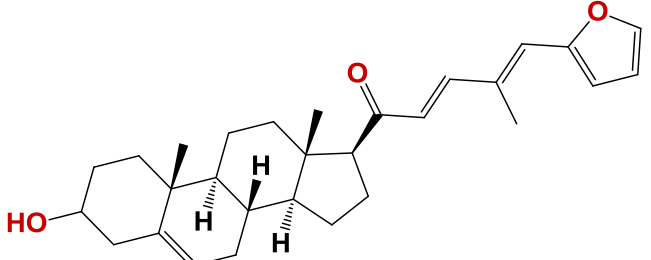
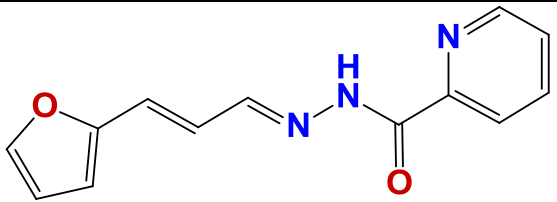
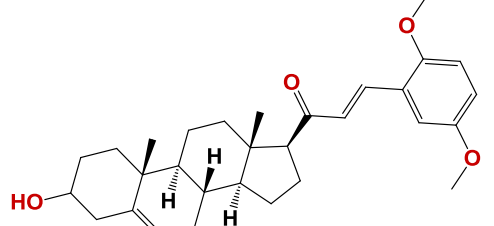
WHO, 2018b. Onchocerciasis [WWW Document]. URL <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/onchocerciasis>

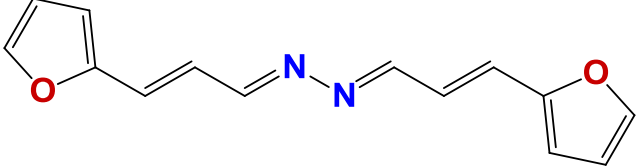
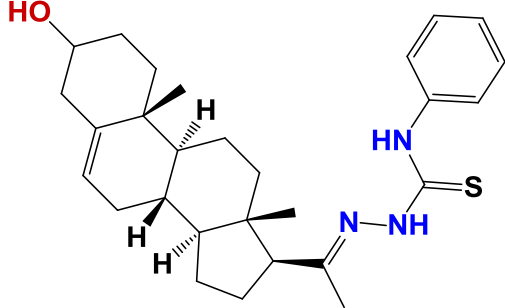
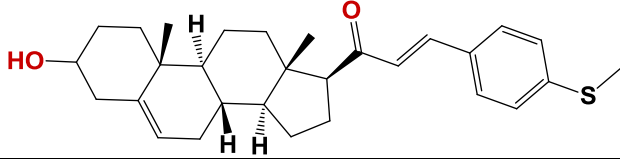
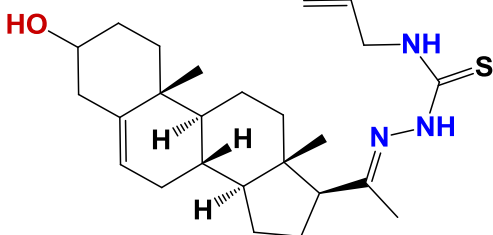
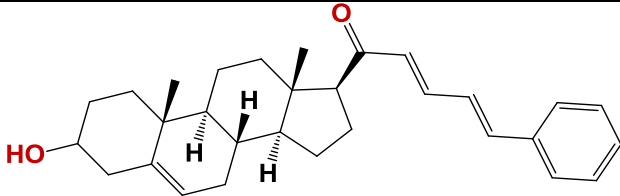
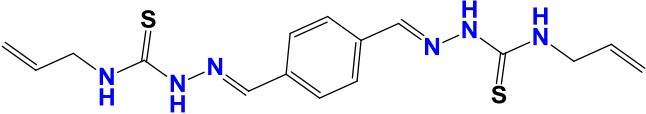
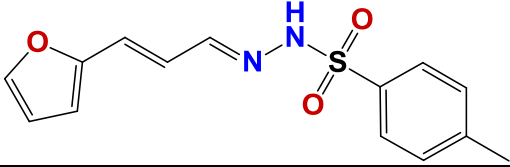
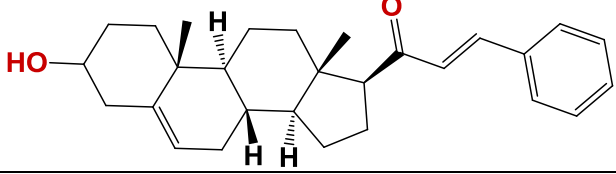
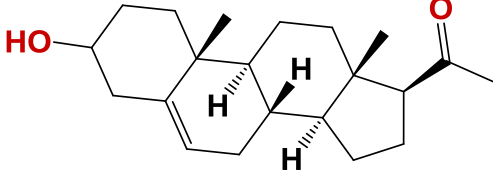
WHO, 2018c. Lymphatic filariasis [WWW Document]. URL <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis>

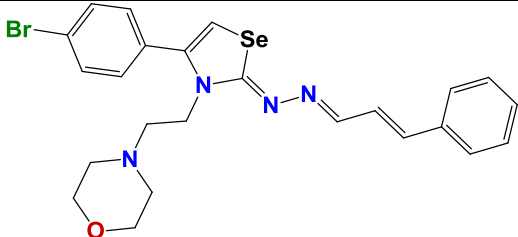
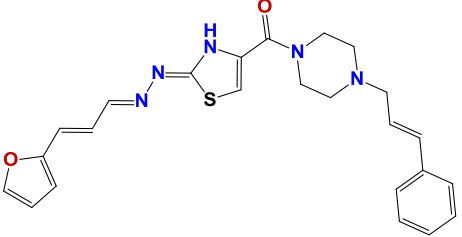
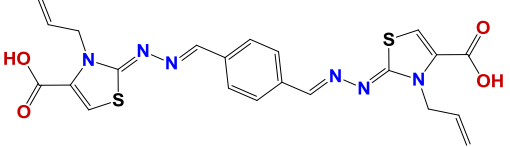
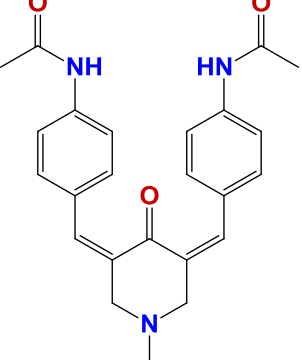
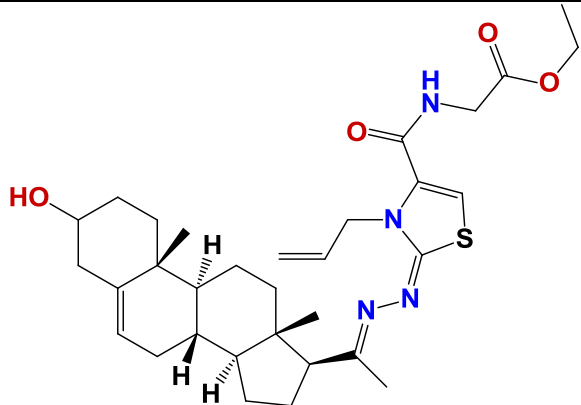
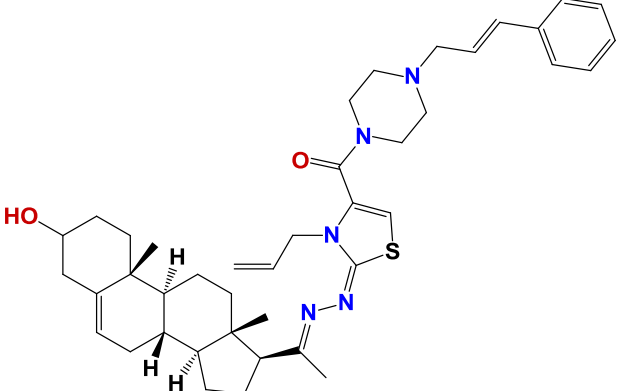
Supporting Information

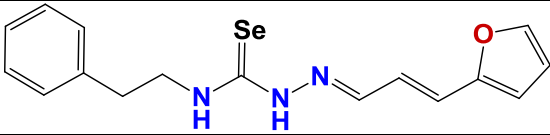
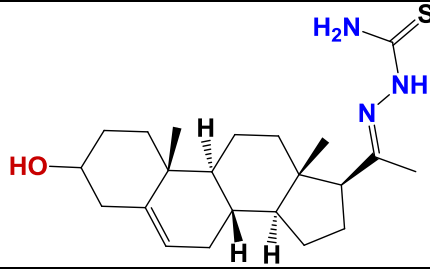
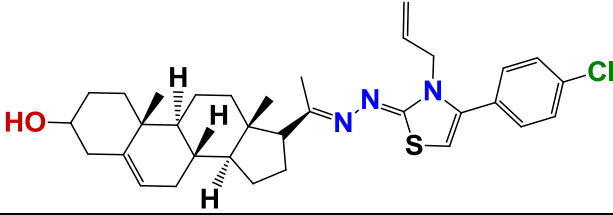
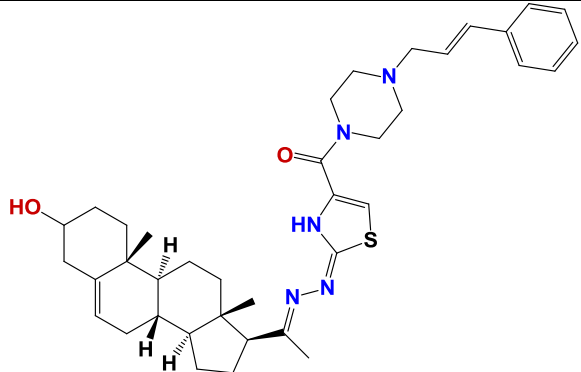
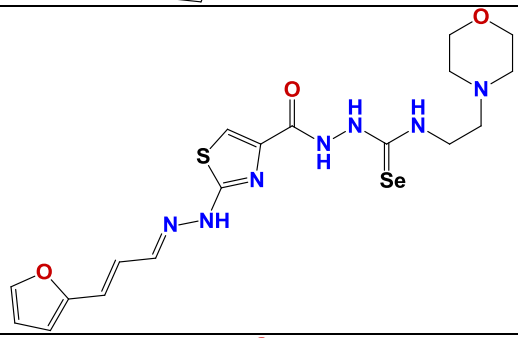
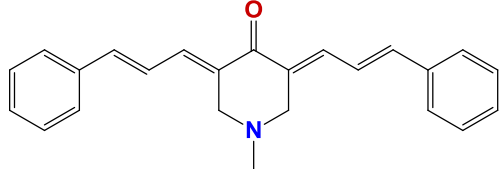
Table S1. List of the 175 selected molecules from the in house library (LIDENSA Chemolibrary) examined in this work and their activity on *C. elegans* motility. The compound code number, structural formula, concentration used and remaining motility are shown. Color code: yellow for moderate activity (65-25% of motility), green for potent activity (25-0% of motility).

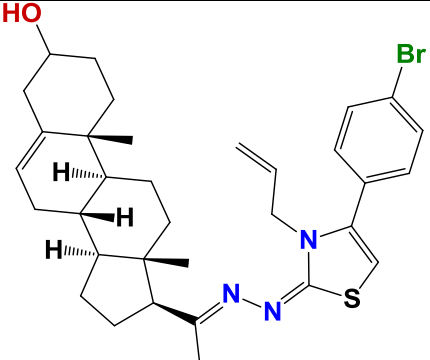
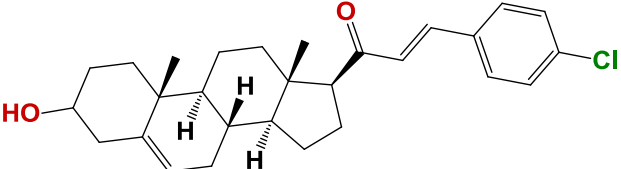
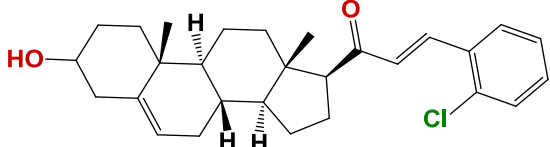
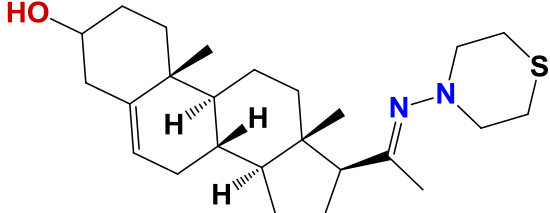
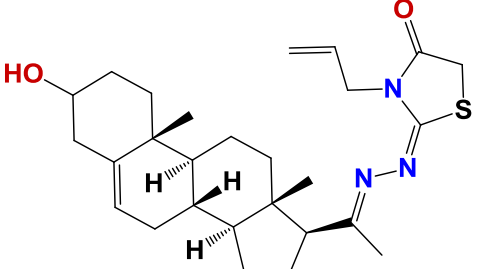
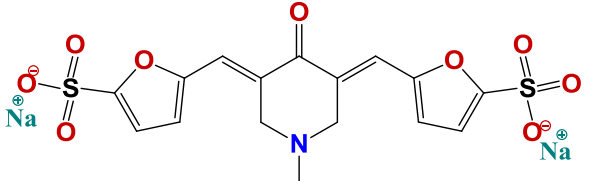
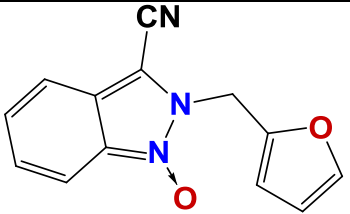
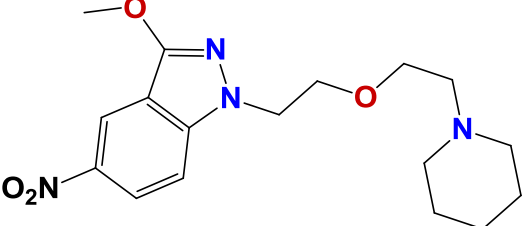
Chemolibrary code	Structure	Concentration (μM)	Motility (%)
1285		24	72
1311		24	68
1319		18	100
1257		21	108
1282		28	62
1289		17	99
1097		27	87
1366		29	111

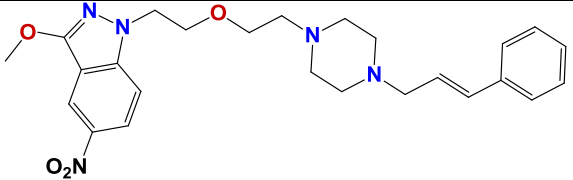
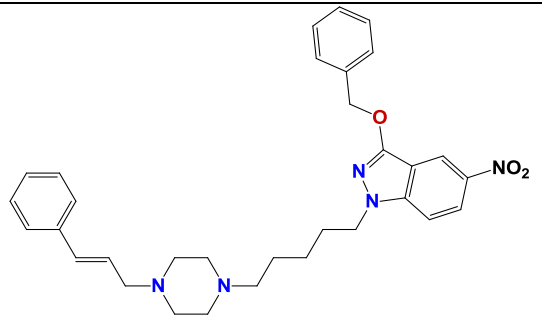
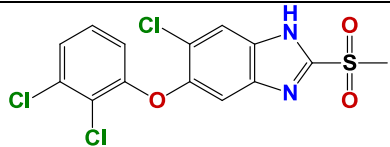
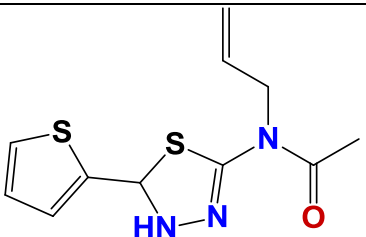
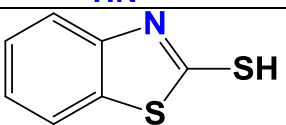
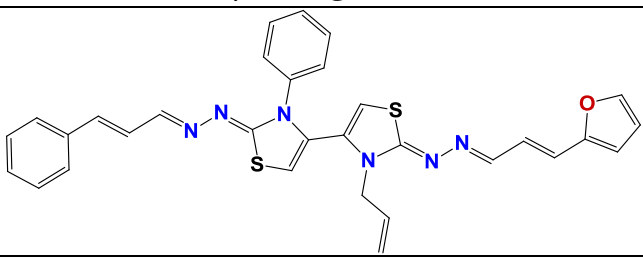
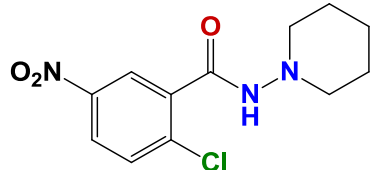
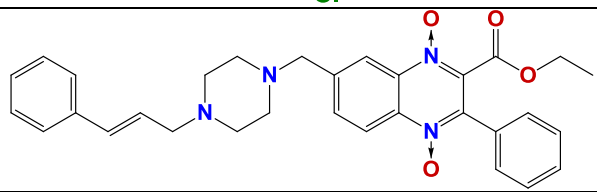
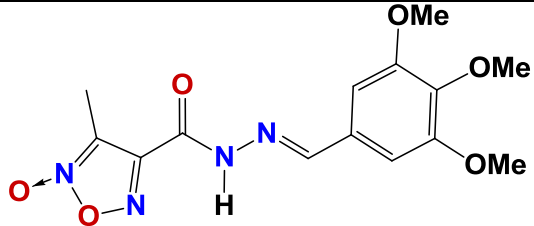
1258		27	116
1219		40	62
1312		50	94
1368		19	105
1287		50	61
1367		50	63
1316		21	106

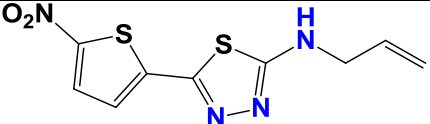
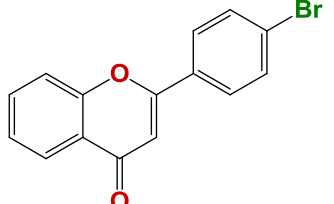
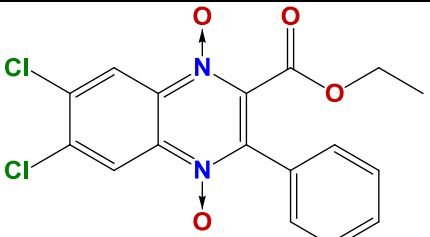
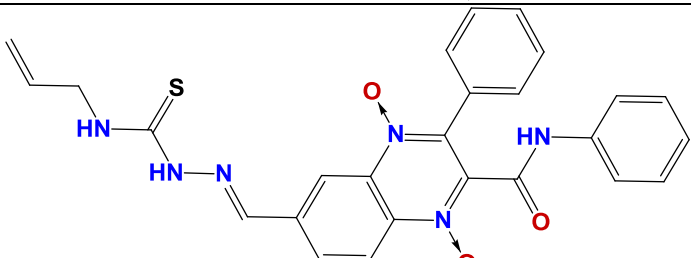
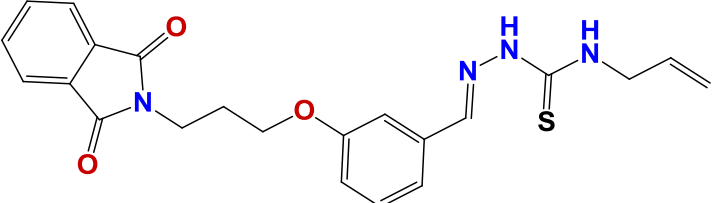
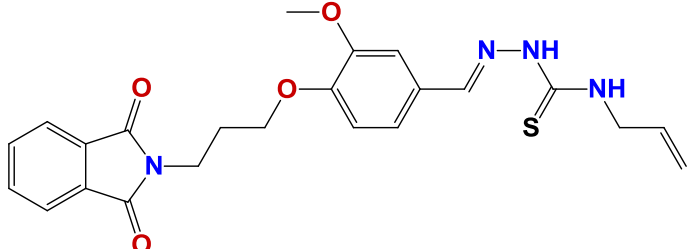
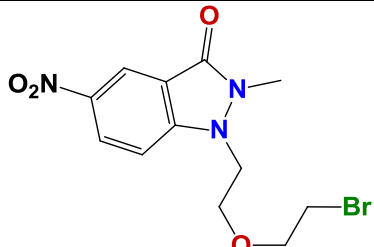
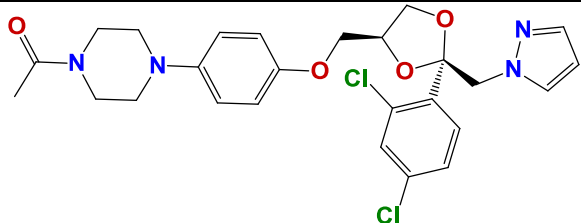
1140		50	23
1291		20	216
1262		17	200
1154		43	107
1279		20	109
1307		14	107
1369		37	84
1288		18	126
1290		19	148

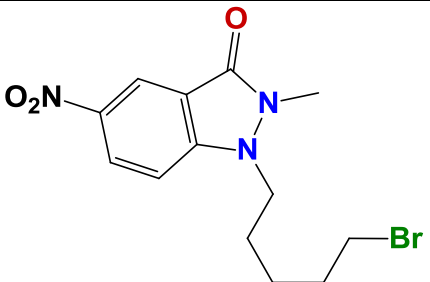
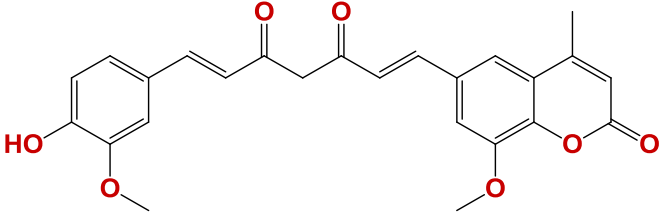
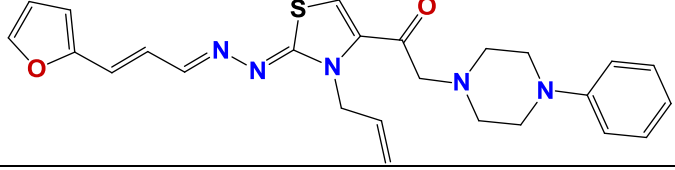
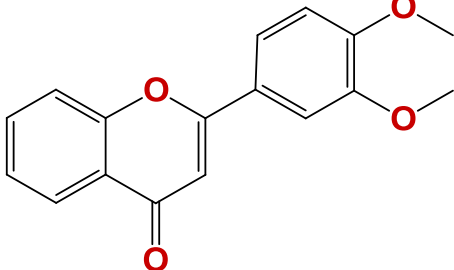
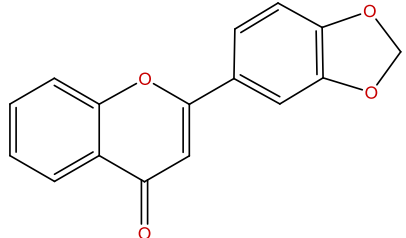
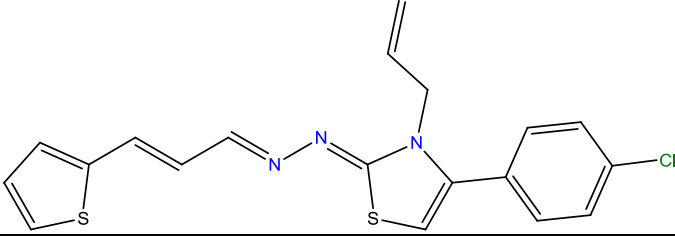
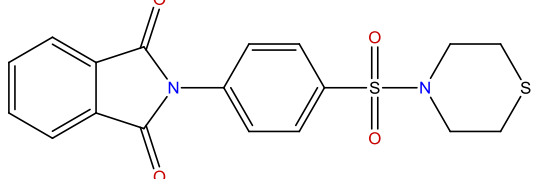
1222		13	145
1364		29	61
1310		30	115
1281		20	122
1263		18	120
1261		19	119

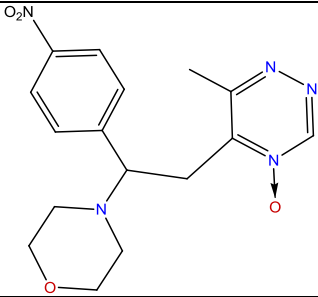
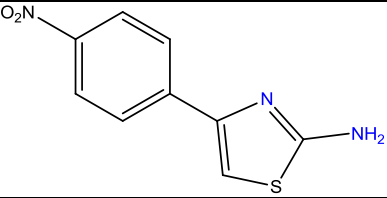
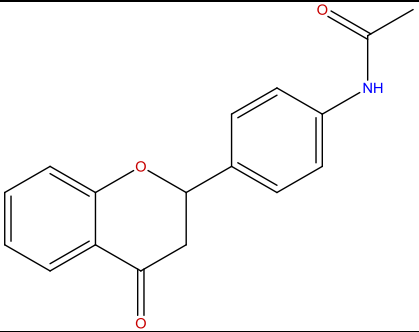
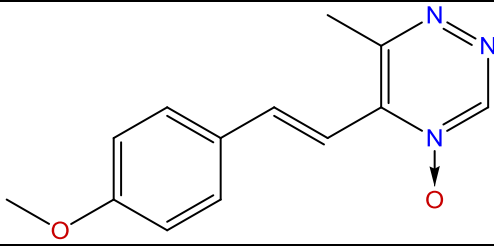
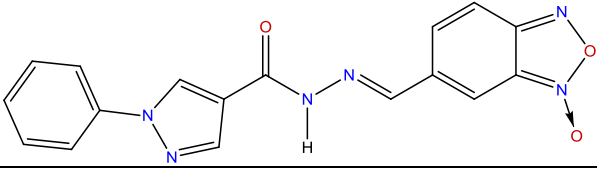
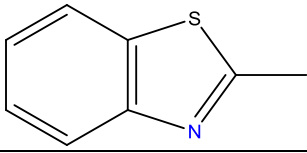
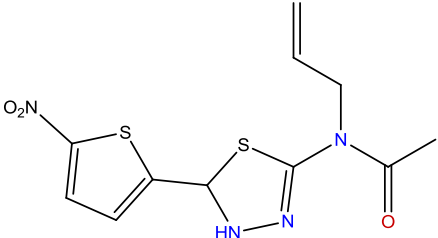
1145		19	139
1260		27	161
1144		30	86
1317		27	142
1365		33	105
1284		38	98

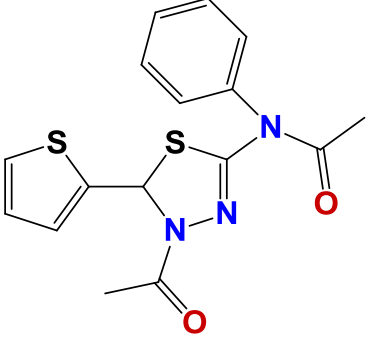
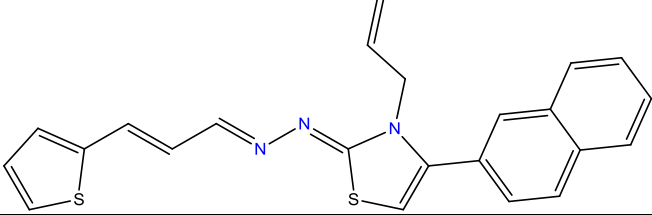
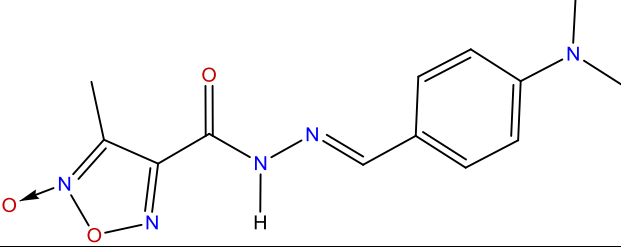
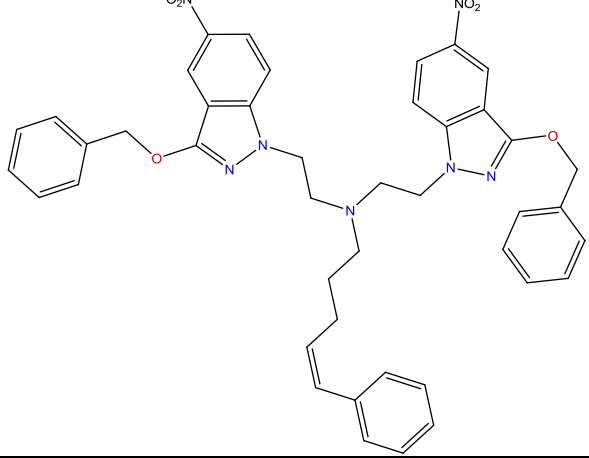
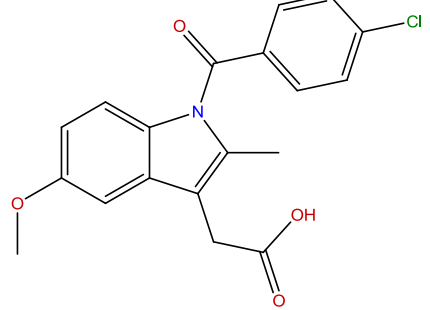
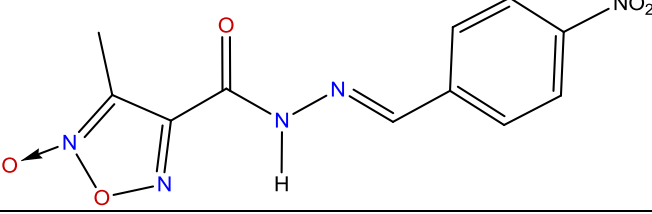
1272		25	55
1256		23	105
1259		35	110
1087		20	112
1125		23	134
1286		17	139
463		44	173
458		17	142

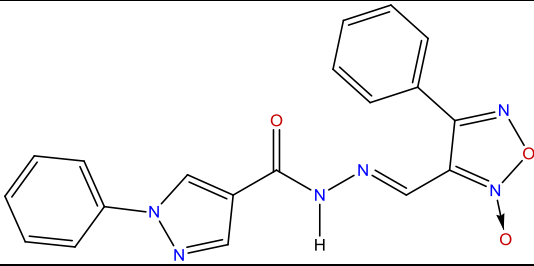
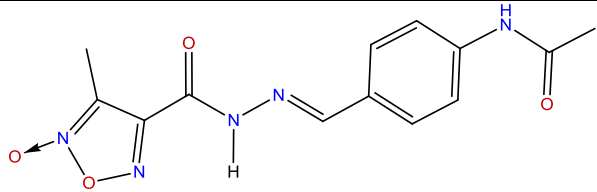
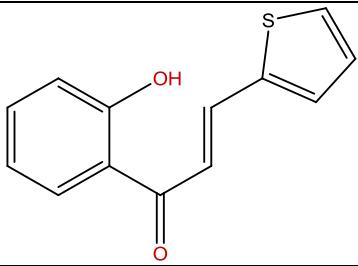
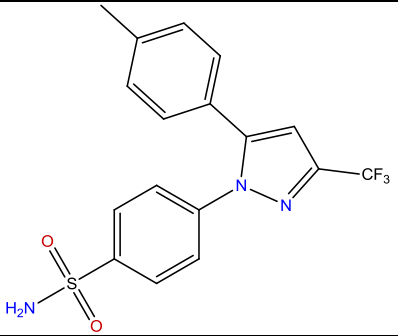
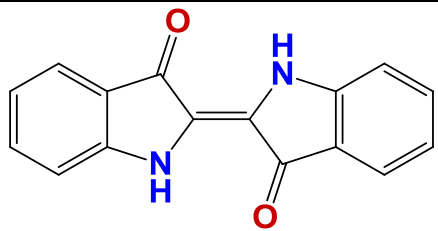
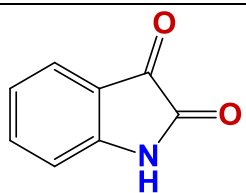
198		15	120
505		50	174
1293		18	146
286		28	107
1318		30	104
791		50	116
523		28	92
221		15	185
1184		18	127

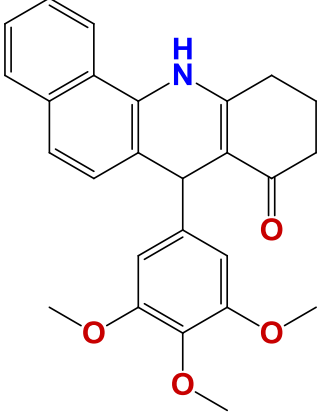
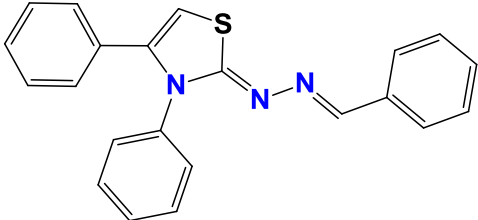
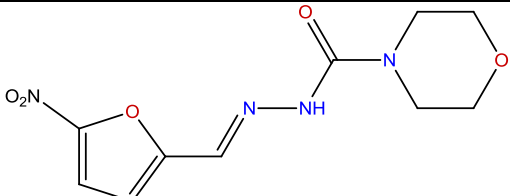
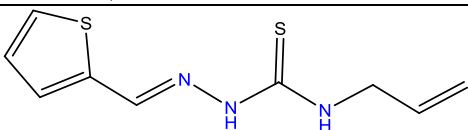
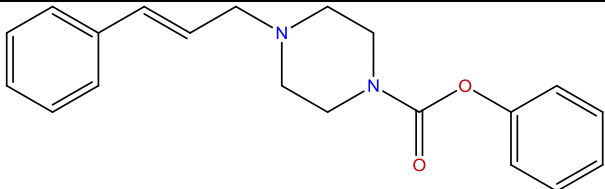
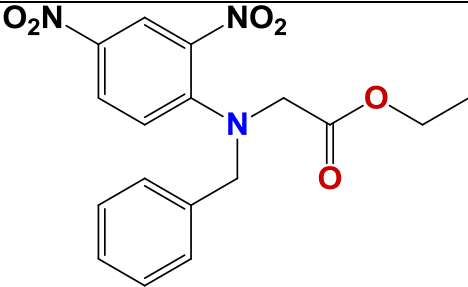
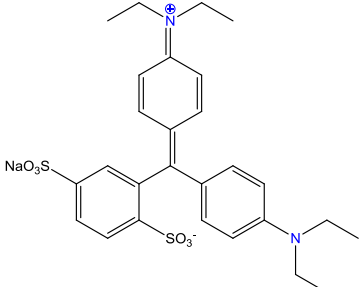
292		14	85
691		24	76
658		14	111
297		50	178
421		20	107
423		18	106
519		45	106
486		13	99

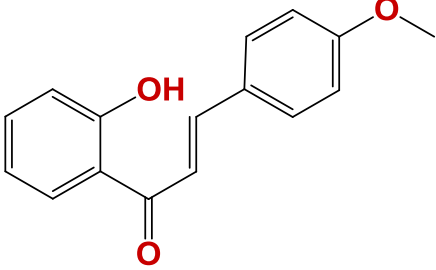
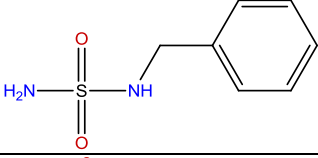
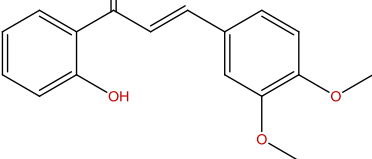
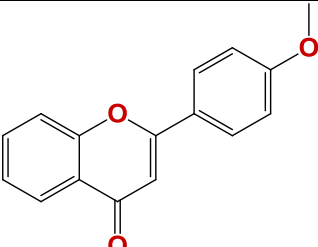
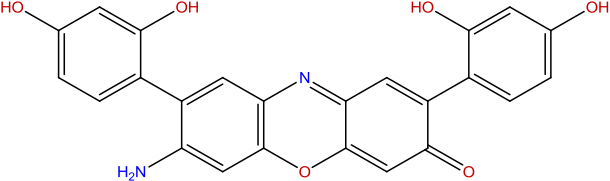
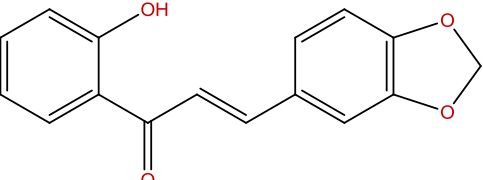
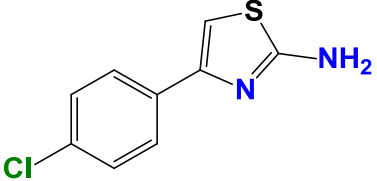
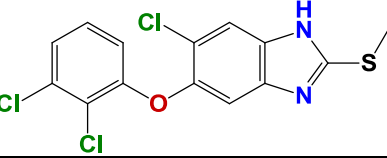
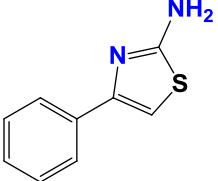
520		40	87
915		50	187
1099		50	80
734		21	119
882		42	137
1134		13	112
1170		24	110

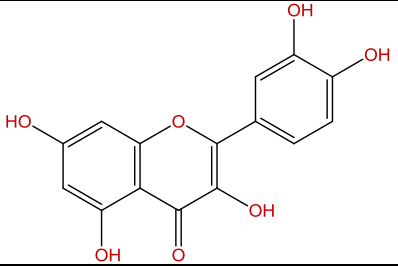
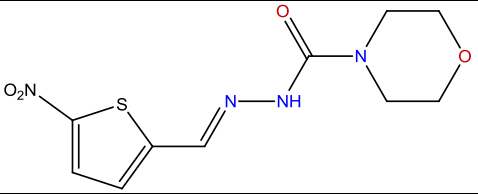
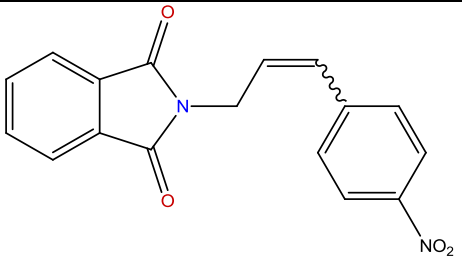
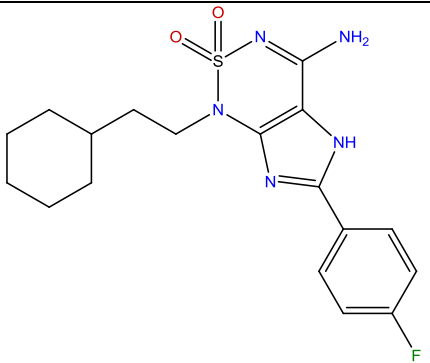
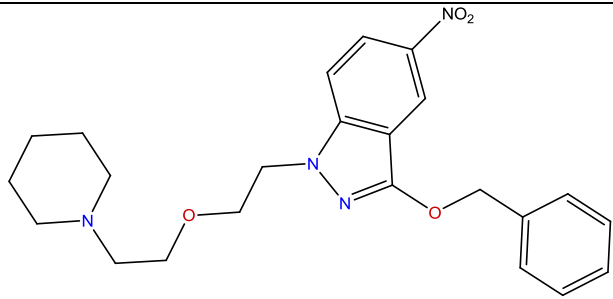
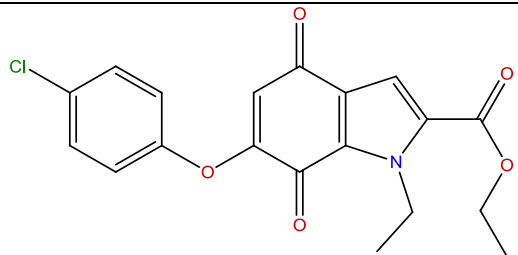
360		50	101
1098		50	188
1342		20	193
210		17	135
1204		22	156
1308		50	113
287		28	75

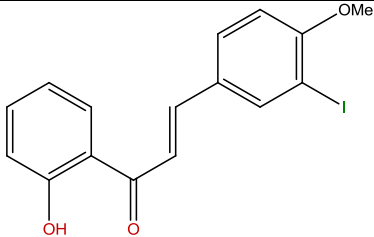
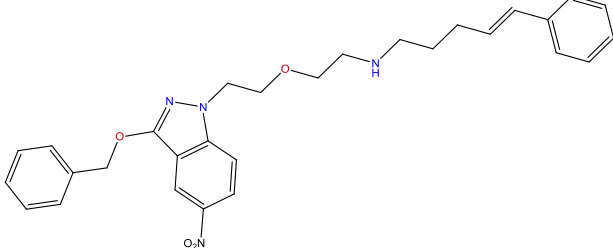
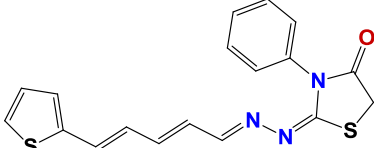
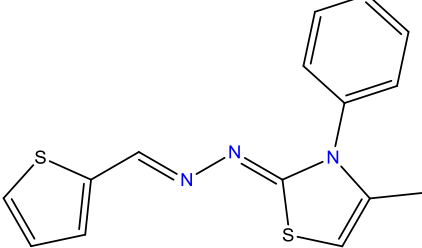
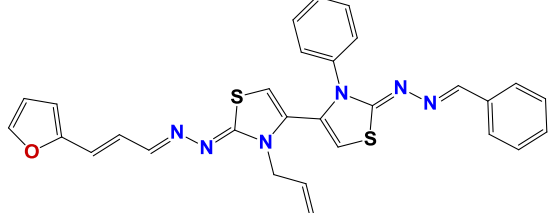
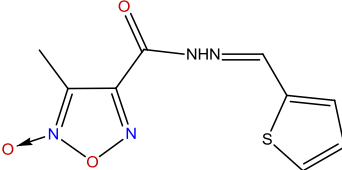
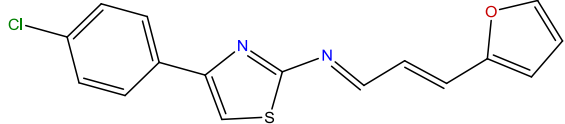
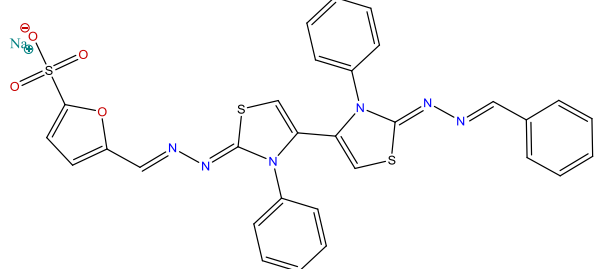
284		25	102
1218		23	107
1199		50	116
503		50	70
1122		15	99
1183		39	194

1206		50	101
1187		44	89
150		37	78
1121		38	69
879		35	67
385		50	83

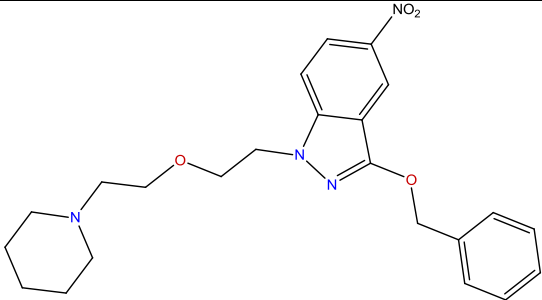
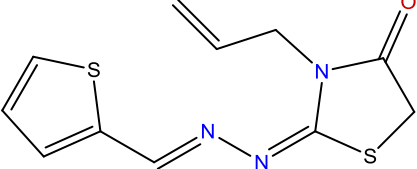
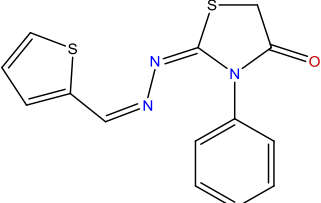
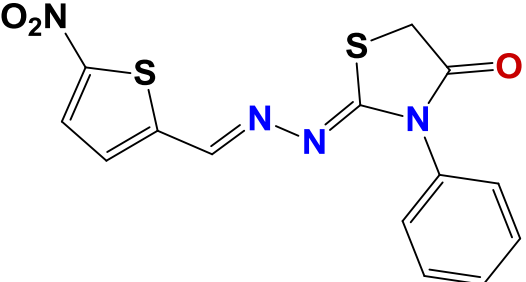
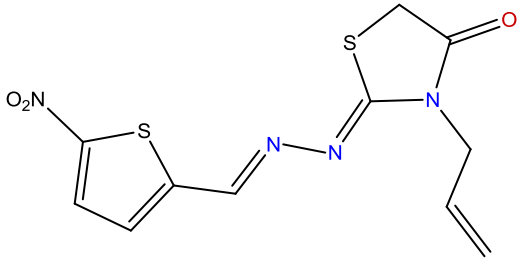
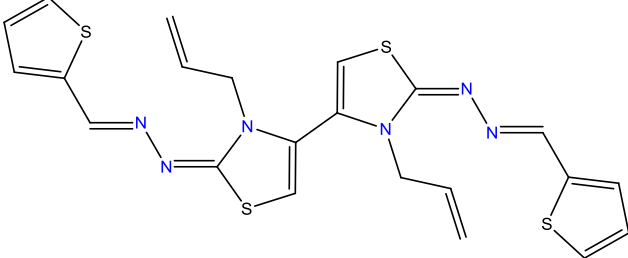
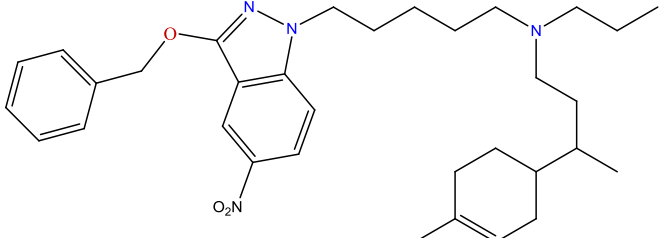
1234		13	80
270		33	78
63		50	80
137		50	98
240		50	128
568		50	58
940		50	102

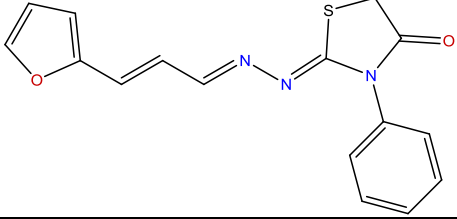
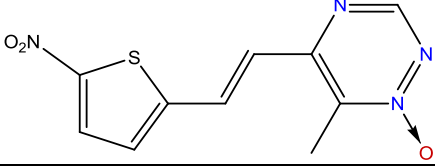
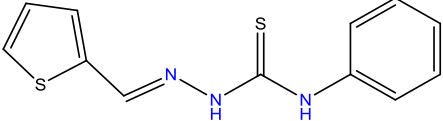
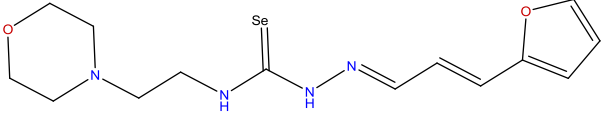
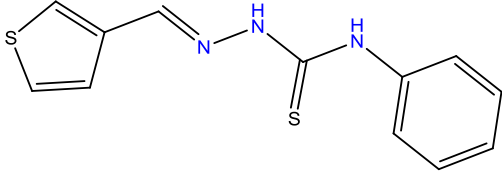
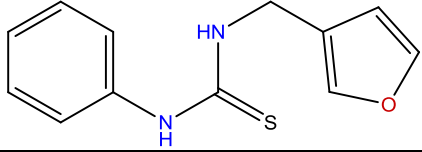
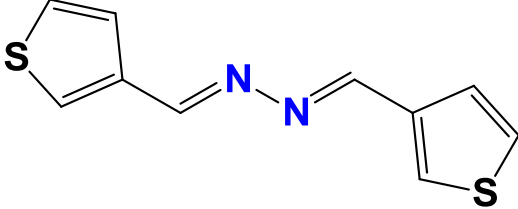
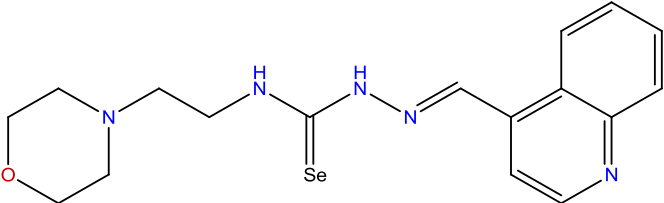
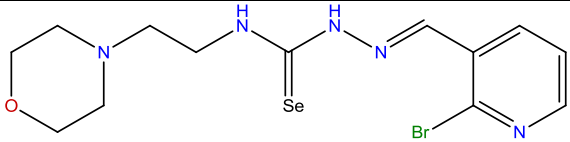
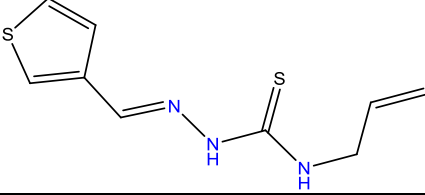
731		50	8
124		50	95
884		50	74
724		50	63
990		50	86
151		50	83
813		50	50
1278		50	60
810		50	93

1337		50	101
139		50	120
608		39	68
706		50	79
457		38	87
1129		50	87

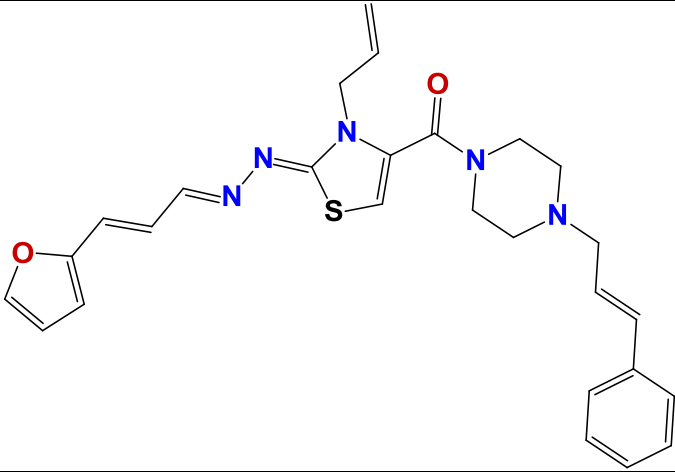
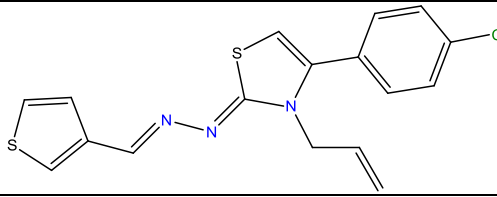
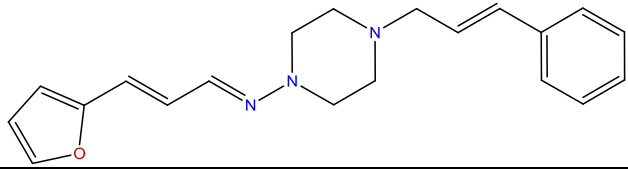
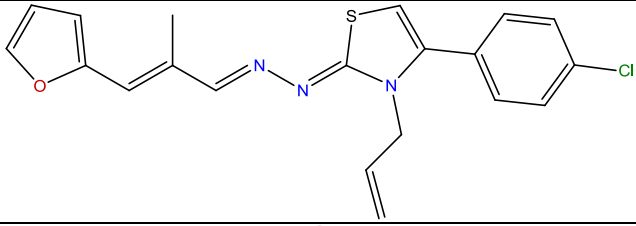
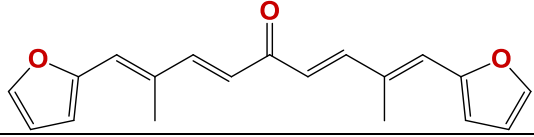
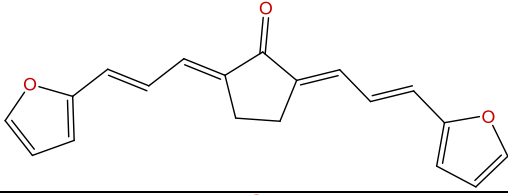
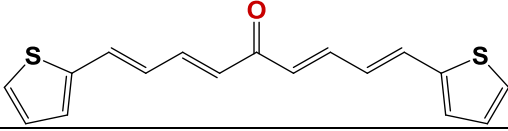
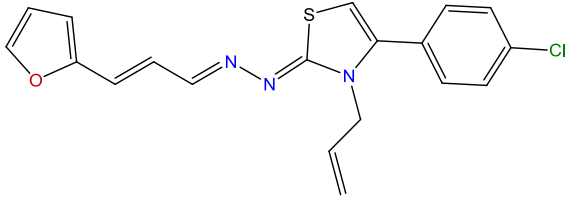
1336		50	113
485		50	76
313		44	63
1103		36	68
782		50	61
1174		50	105
910		50	84
784		50	102

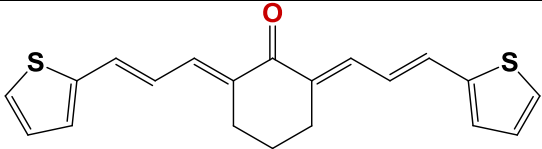
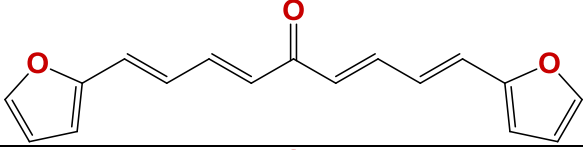
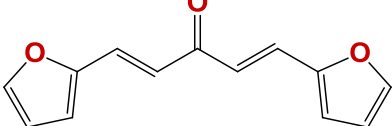
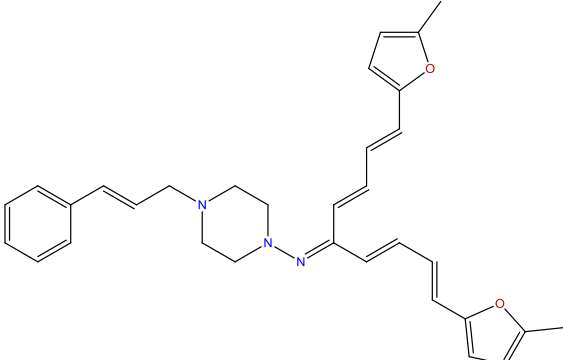
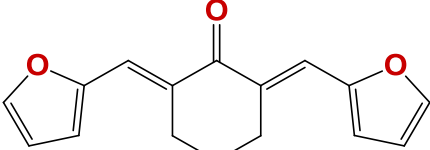
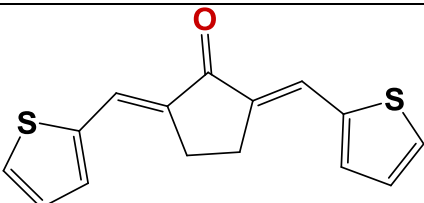
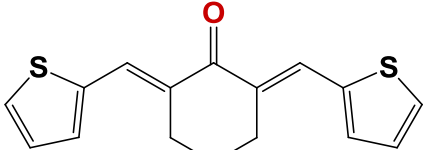
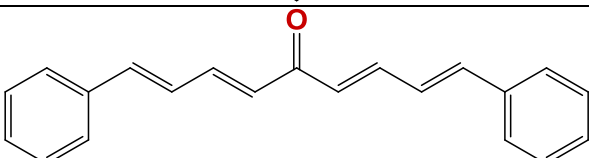
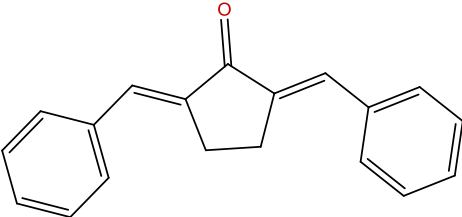
489		45	85
144		50	89
310		50	169
272		50	71
145		50	60
783		50	83
301		36	94
901		50	87

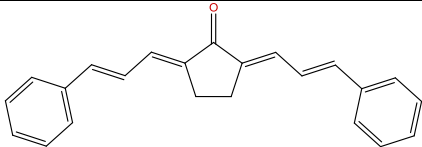
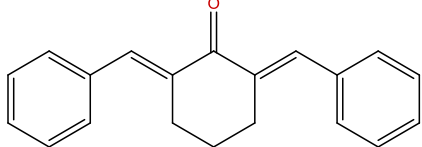
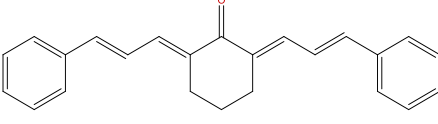
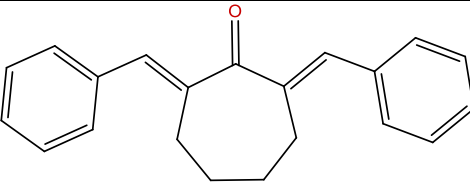
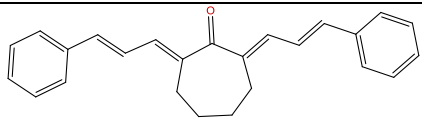
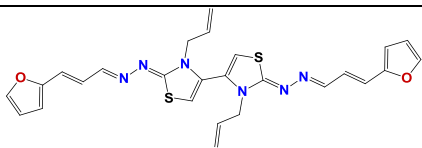
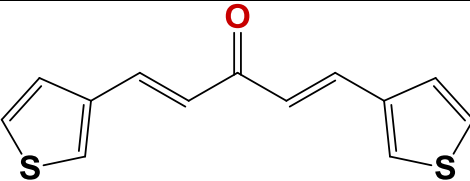
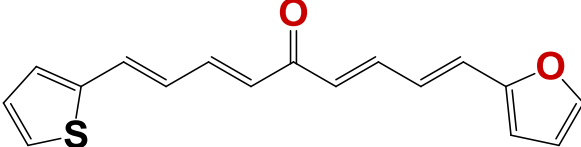
194		50	78
273		50	93
293		50	111
262		47	59
129		50	105
288		50	110
199		50	104

282		50	75
214		50	94
279		50	89
1147		50	90
1383		50	90
694		50	64
1381		50	2
1379		50	100
1380		50	132
911		50	168

1377		50	45
1378		50	84
1385		50	85
1384		50	55
872		50	82
796		50	7
1019		50	74
1018		34	115

314		45	60
877		50	68
912		50	92
873		50	67
809		50	55
1223		50	96
798		39	63
266		36	124

1245		50	23
793		50	68
795		50	0
1102		50	114
808		50	53
1248		50	64
807		50	82
797		50	82
1247		50	80

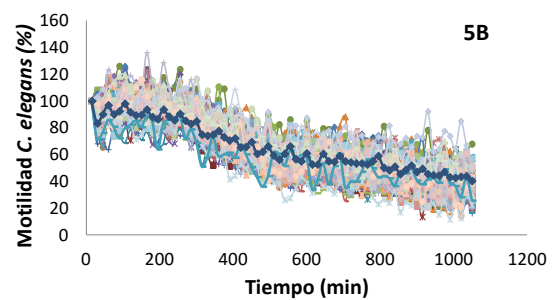
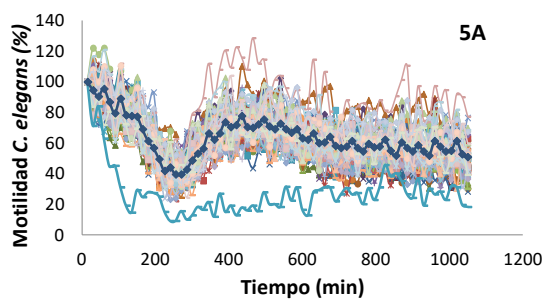
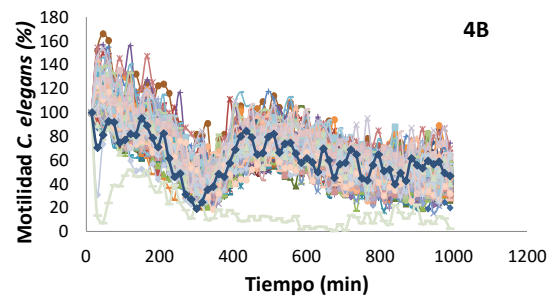
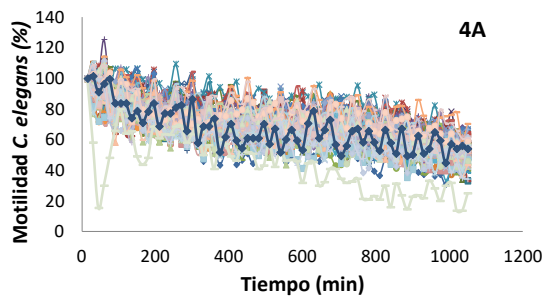
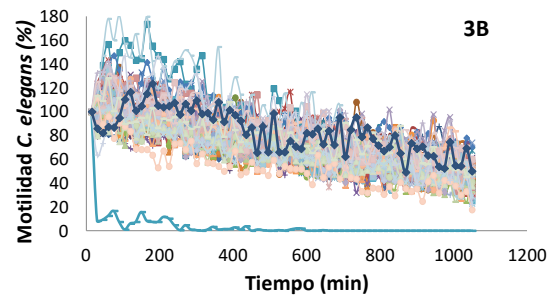
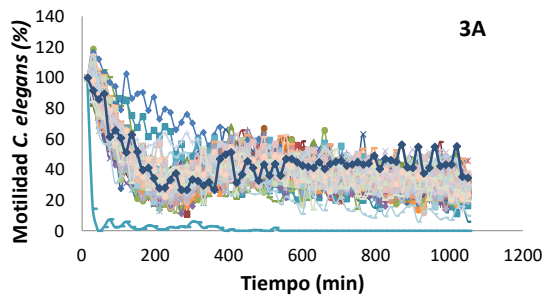
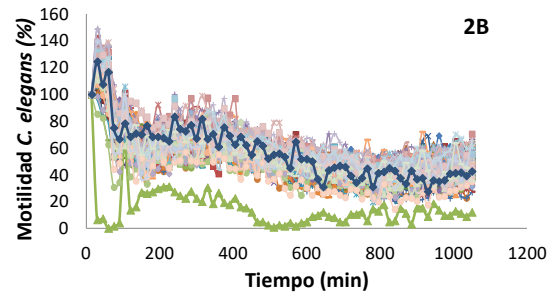
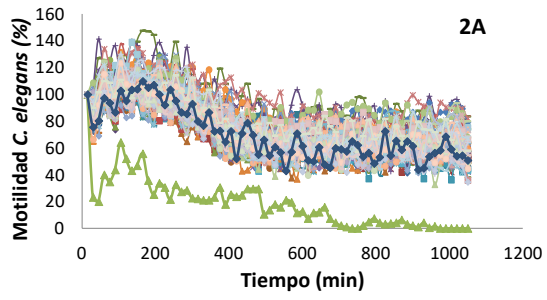
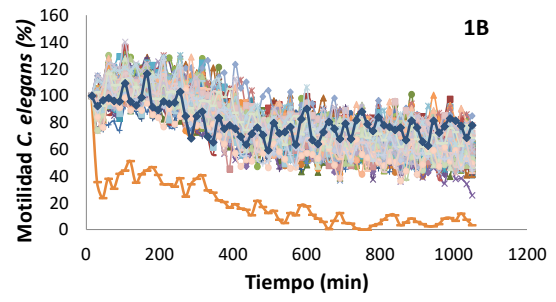
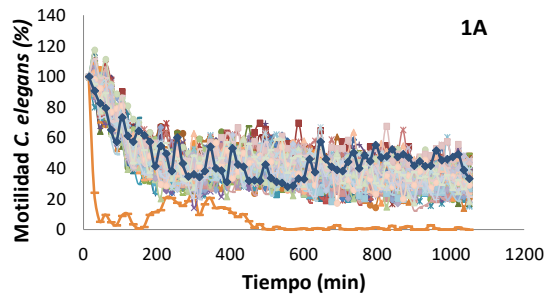
1246		50	86
799		50	83
800		50	73
803		50	78
804		50	63
295		50	86
1387		50	69
1414		50	73

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE 2: BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS NEMATICIDAS DE EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES

Como fue explicado previamente, Nature Bank es una biblioteca de extractos naturales que contiene más de 200.000 fracciones, de los cuales fueron testeadas 10.240, todas ellas por duplicado. Es importante recordar que cada extracto se encuentra previamente subdividido en 5 fracciones. El fraccionamiento fue realizado mediante HPLC por hidrofobicidad creciente y las 10240 fracciones evaluadas se corresponden a aproximadamente 2000 extractos diferentes. La cantidad de cada fracción es la obtenida a partir de 250 µg de biota y se define como 250 µgE.

La posible actividad nematocida de las mismas fue evaluada en el ensayo de motilidad de *C. elegans* con el equipo WMicrotracker. Los ensayos tuvieron una duración de 17,5 horas y la concentración de las fracciones en el bioensayo fue de 2,5 µgE/µL. Las réplicas de las placas fueron testeadas en todos los casos con diferentes lotes de gusanos.

El cribado de la biblioteca de productos naturales permitió la identificación de 7 hits que afectaron *C. elegans* en mayor o menor grado (Fig. 7). Es importante señalar que las 7 fracciones positivas identificadas se corresponden a 7 extractos diferentes, aunque todos obtenidos de esponjas de la clase *Demospongiae* (Tabla 8). Además, a excepción del último positivo, las fracciones activas son las más hidrofóbicas de sus respectivos extractos. En el caso del último, se trata de la segunda fracción más hidrofóbica de su serie.



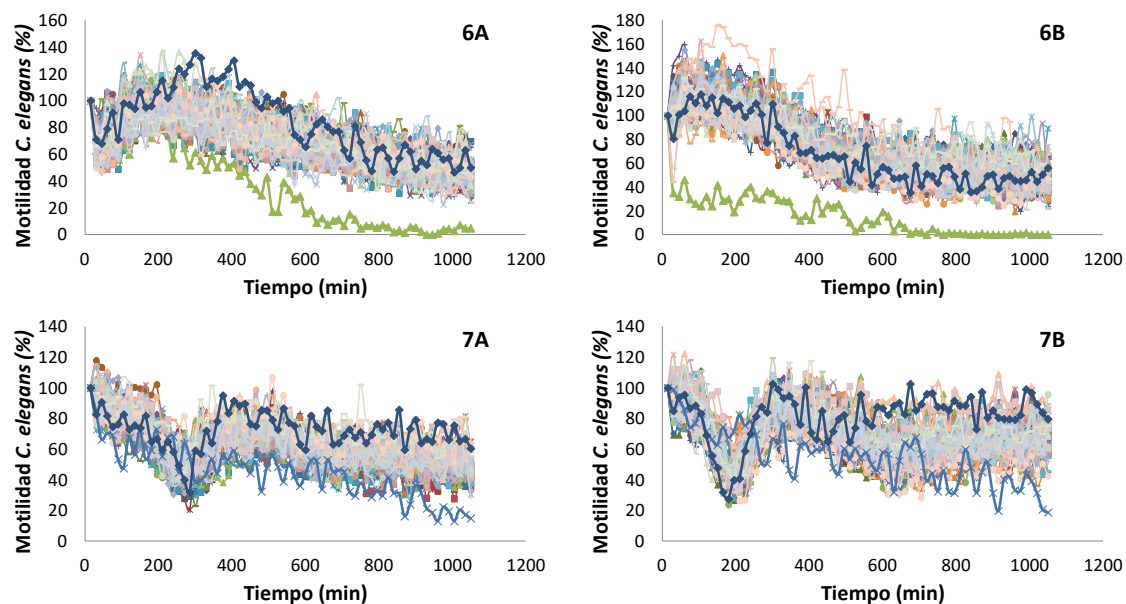


Figura 7: Cribado de Nature Bank utilizando *C. elegans*. Gráficas de microplacas conteniendo fracciones positivas del ensayo de motilidad de larvas L4 de *C. elegans* incubadas con 1 μ L de las fracciones a evaluar en un volumen final de 100 μ L de K salino, conteniendo 0,015% de BSA y 1% de DMSO. Por lo tanto, la concentración de las fracciones en el bioensayo es de 2,5 μ gE/ μ L. Cada curva representa el movimiento de los gusanos en cada pocillo. Las gráficas del lado izquierdo (A) corresponden a los positivos de la primera ronda, mientras que las ubicadas del lado derecho (B) corresponden a sus respectivos duplicados. En cada placa hay 16 pocillos control (conteniendo 1% DMSO), representados por la curva azul oscura presente en todos los gráficos.

Tabla 8: Organismos fuente de las fracciones positivas.

Fracción	Organismo
1	<i>Agelas mauritania</i>
2	<i>Agelas axifera</i>
3	<i>Haliclona chrysa</i>
4	<i>Neopetrosia pacifica</i>
5	<i>Oceanapia ramsayi</i>
6	<i>Haliclona chrysa</i>
7	<i>Neopetrosia pacifica</i>

Es interesante notar como los pocillos sin actividad forman parte de una “nube de curvas”, la cual contiene al control negativo en todos los casos. Las fracciones activas se separaron de la nube, siendo fácilmente identificables. La actividad de las fracciones positivas varió desde una

parálisis y muerte total y rápida de los gusanos, hasta una afectación más suave. La cinética de la actividad también fue diferente. Algunas fracciones, como por ejemplo la número 3, paralizaron a los gusanos muy rápidamente. Otras, como la fracción 7, tardaron en inhibir la motilidad.

A excepción del quinto *hit*, el resto de los positivos fueron exitosamente confirmados en sus respectivos duplicados (Fig. 7). Además, sus curvas de movimiento entre la primera y segunda ronda son muy similares. La actividad siguió la misma tendencia y fue detectada en los mismos tiempos.

Por otra parte, los gusanos en los pocillos positivos fueron observados bajo la lupa a las 24 horas confirmándose la actividad (ausencia de motilidad) en todos los casos. Incluso en aquellos como el duplicado del quinto positivo, donde no fue posible detectar la actividad en el ensayo de motilidad. Más aún, en ninguno de los 7 hits encontrados los L4 se desarrollaron a adultos.

La siguiente etapa fue la realización de curvas dosis-respuesta de las fracciones identificadas como positivas. Es importante señalar que las muestras para las curvas fueron enviadas nuevamente desde Australia, con un protocolo de extracción levemente diferente. Por esta razón existía el riesgo de que los principios activos eluyeran en una fracción diferente a la originalmente identificada. Es por esto que se realizaron ensayos confirmatorios con las 5 fracciones que se correspondían a cada uno de los 7 extractos con actividad nematocida. A modo de ejemplo se muestran las curvas dosis-respuesta de las fracciones del hit 2 (Fig. 8). La numeración en la figura hace referencia a cada una de las 5 fracciones con hidrofobicidad creciente, siendo la quinta la más hidrofóbica.

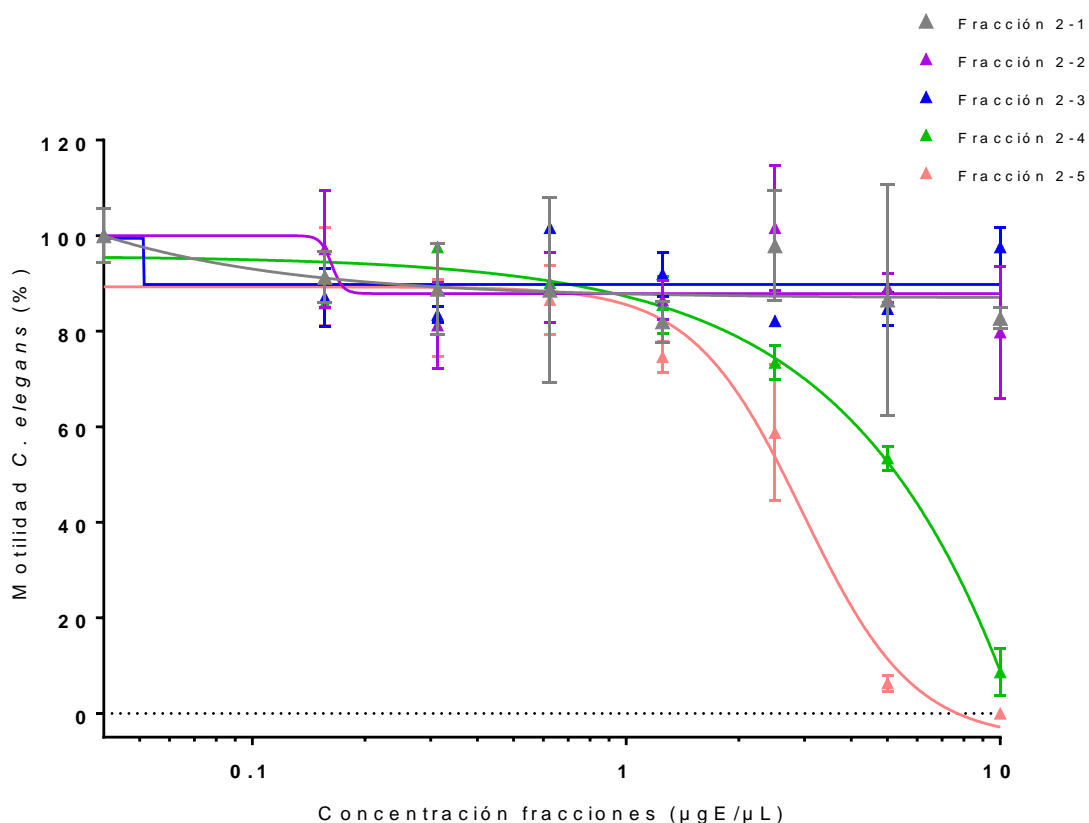


Figura 8: Curvas de dosis-respuesta confirmatorias de las fracciones correspondientes al hit 2 de Nature Bank utilizando *C. elegans*. Las fracciones fueron ensayadas por duplicado frente a larvas L4 de *C. elegans*. Su motilidad fue evaluada en el equipo WMicrotracker. Las concentraciones evaluadas fueron: 0, 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5, 5 y 10 μgE/μL. La numeración de 1 a 5 corresponde a la hidrofobicidad, siendo 5 la fracción más hidrofóbica de la serie.

Para todos los positivos la fracción activa fue la misma que la original. Sin embargo, en algunos casos como el mostrado fue posible detectar una actividad moderada en la fracción contigua a la positiva. Con esta información se procedió realizando curvas de dosis-respuesta de las fracciones originalmente identificadas como positivas (Fig. 9). A modo de ejemplo se muestra la curva de dosis-respuesta del hit 2 con sus respectivos puntos y desvíos estándar. Para el ensayo se realizaron diluciones seriadas al medio, siendo 10 μgE/μL la concentración máxima evaluada. Cabe recordar que la concentración utilizada en el cribado fue de 2,5 μgE/μL.

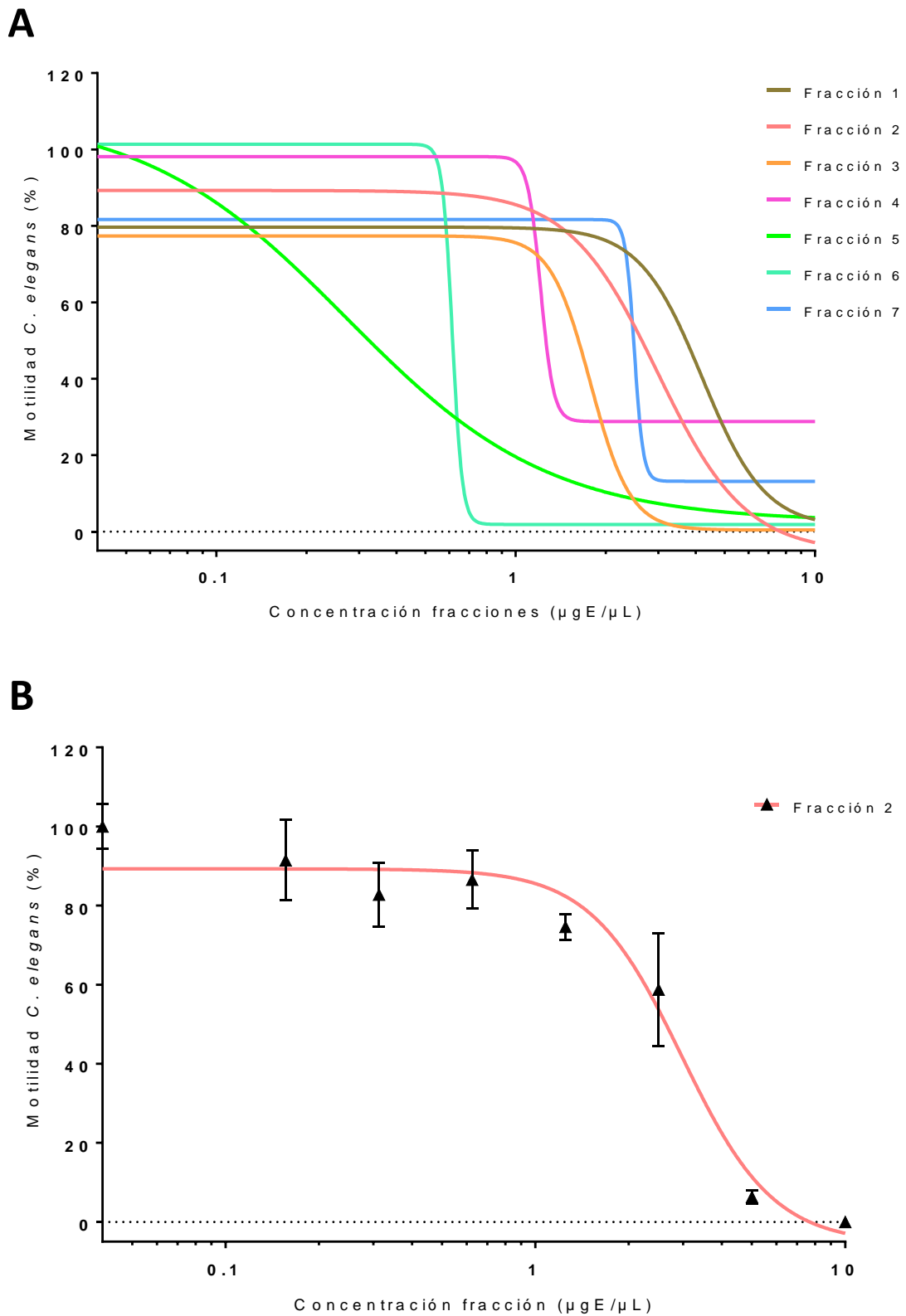


Figura 9: Curvas de dosis-respuesta de las fracciones positivas de Nature Bank utilizando *C. elegans*. Parte A: todos los 7 positivos. Parte B: hit 2. Las fracciones positivas fueron ensayadas por duplicado frente a larvas L4 de *C. elegans*. Su motilidad fue evaluada en

el equipo WMicrotracker. Las concentraciones evaluadas fueron: 0, 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5, 5 y 10 $\mu\text{gE}/\mu\text{L}$.

Todas las fracciones fueron nuevamente activas. Las fracciones 3, 5 y 6 fueron las que paralizaron a *C. elegans* a una menor concentración. Sin embargo, la curva dosis respuesta de la fracción 5 es diferente a las demás. Los gusanos reducen su motilidad a concentraciones muy bajas de la fracción, pero la misma no es capaz de paralizar totalmente, incluso a las concentraciones más altas evaluadas. La alta potencia de las fracciones 3 y 6 confirmaron los resultados esperados de acuerdo a la información obtenida en las rondas de cribado. No obstante, en esta oportunidad la fracción 1 fue más inocua y la 5 más activa para los gusanos con respecto al cribado original.

Por otra parte, las fracciones 4 y 7 no fueron capaces de paralizar en su totalidad a los gusanos en el tiempo ensayado (17,5 horas). Las mismas son capaces de reducir la motilidad, incluso a concentraciones más bajas que otras fracciones, pero no de eliminarla completamente. Probablemente esto se deba a que el mecanismo de acción por el cual actúan requiere de tiempos mayores para eliminar el movimiento en un 100%, o bien que su potencia o su blanco de acción no sean lo suficientemente óptimos. Otra razón alternativa podría ser que los principios activos no se encuentren en cantidad suficiente en las fracciones.

La cinética con que las fracciones afectan a los gusanos también puede ser visualizada. A modo de ejemplo se muestra una gráfica con la motilidad de *C. elegans* siendo afectada por diferentes concentraciones de la fracción 2 con respecto al tiempo (Fig. 10).

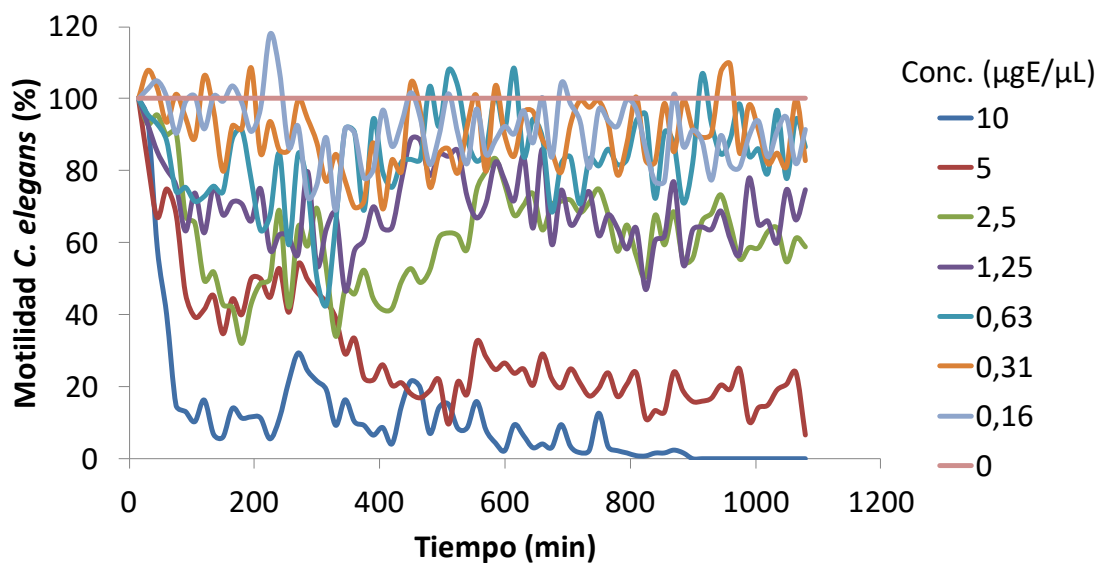


Figura 10: Actividad nematocida de la fracción 2 de Nature Bank en el tiempo utilizando *C. elegans*. Las fracciones fueron ensayadas por duplicado frente a larvas L4 de *C. elegans*. Su motilidad fue evaluada en el equipo WMicrotracker.

La motilidad de los gusanos cayó rápidamente en las dos concentraciones más altas. Además, en las tres concentraciones siguientes los gusanos son afectados, recuperándose en diferente medida. Por otra parte, concentraciones de 0,31 µgE/µL o menos no parecen afectar a los gusanos sustancialmente.

Como una mínima y sencilla aproximación al mecanismo de acción de los positivos, se observaron los fenotipos de muerte de los gusanos al estar expuestos a los mismos (Fig. 11). Los gusanos afectados por la fracción 2 presentan un fenotipo particular en el cual parecería que su intestino hubiera sido externalizado por su boca. Por otro lado, los gusanos de la fracción 3 parecen haberse encogido, habiéndose además desprendido la hipodermis de la cutícula. El fenotipo de los gusanos de la fracción 6 podría interpretarse como más similar al producido por la fracción 3, pero con mucho menor grado de desprendimiento de la cutícula. Con esta información es posible proponer que la fracción 2 actúa con un mecanismo de acción diferente al de los otros 2. Estos últimos podrían actuar por mecanismos similares.

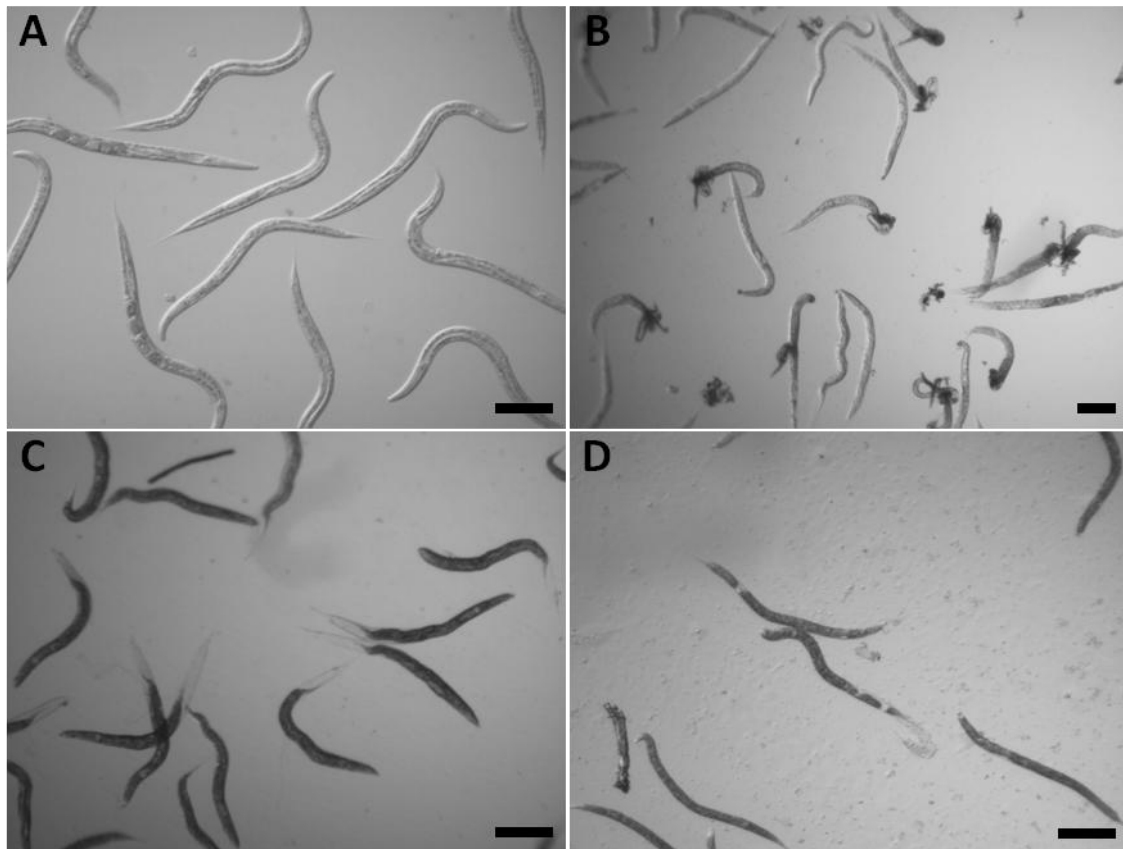


Figura 11: Efecto de algunas de las fracciones positivas de Nature Bank sobre *C. elegans* a 24 horas. Las fracciones positivas fueron ensayadas a 10 $\mu\text{gE}/\mu\text{L}$ frente a larvas L4 de *C. elegans*. **Panel A:** control negativo. **Panel B:** fracción 2. **Panel C:** fracción 3. **Panel D:** fracción 6.

El cribado de bibliotecas sobre el organismo modelo *C. elegans*, aumenta enormemente las probabilidades de obtener moléculas que actúen sobre nemátodos parásitos. Sin embargo, la única forma de confirmar la acción en parásitos, es efectivamente evaluar su acción frente a los mismos. Por esta razón, larvas L3 de *Haemonchus* spp., gentilmente provistas por la Dra. Laura Domínguez, fueron incubadas junto a cada una de las 7 fracciones positivas por 24 horas a modo confirmatorio (Tabla 9).

Tabla 9: Evaluación de las actividades de las fracciones positivas frente a larvas L3 de *Haemonchus* spp. Los gusanos fueron incubados con las fracciones a una concentración de 10 $\mu\text{gE}/\mu\text{L}$ por 24 horas. La viabilidad se determinó mediante observación bajo lupa.

Fracción	Viabilidad de <i>Haemonchus</i> spp.
1	No afectados

2	Afectados
3	Afectados
4	Afectados
5	Muertos
6	Muertos
7	No afectados

Los gusanos *Haemonchus* spp. no son fácilmente detectables por el equipo WMicrotracker, por lo que la determinación de su viabilidad se realizó mediante observación bajo lupa. De esta forma, las fracciones pueden ser clasificadas en 3 grupos diferentes: altamente activas (5 y 6), moderadamente activas (2, 3 y 4) y no activas (1 y 7). Es interesante notar cómo, para este pequeño grupo de 7 fracciones, la actividad de las mismas sobre *C. elegans*, se correlaciona con su actividad sobre *Haemonchus* spp.

Los compuestos nematicidas deben ser, además de altamente activos frente a gusanos parásitos, inocuos para los hospederos (bovinos, ovinos, humanos, etc). De forma de evaluar la toxicidad de las fracciones activas frente a vertebrados, se utilizó al organismo modelo zebrafish. El mismo permite realizar ensayos en tiempos considerablemente menores que los roedores; solo se requiere de una semana para un ensayo de toxicidad completo. Para esto se utilizan larvas de pez de 96 hpf y se las incuban 24 horas con los compuestos a evaluar. Para determinar la viabilidad se examinan las larvas bajo la lupa y se observa la presencia o ausencia de latido del corazón.

Los resultados obtenidos indicaron que las fracciones 2 y 4 fueron las menos tóxicas, mientras que las 5 y 6 las más tóxicas (Tabla 10). Más allá de estas diferencias, todas las fracciones parecerían ser más tóxicas para zebrafish que para los gusanos. Sin embargo, es importante señalar que ambos ensayos no son comparables en varios sentidos. Por un lado, el tiempo final es más largo en el ensayo de zebrafish que en el de *C. elegans* (24 vs. 18 horas). Además, se utilizan larvas de pez recién eclosionadas y no organismos más cercanos al estadio adulto como con *C. elegans*. Por otra parte, los gusanos suelen ser inherentemente más resistentes a compuestos químicos o xenobióticos que los peces, al tiempo que los embriones de vertebrados son, por el contrario, particularmente sensibles¹⁶³.

Conjuntamente, una diferencia adicional entre los ensayos radica en los diferentes *buffers* en los que se incuban a los organismos con las moléculas a evaluar; en particular la presencia de

BSA en el ensayo con *C. elegans*. En el ensayo con zebrafish, en cambio, lo único hidrofóbico presente en los pocillos son los peces, lo que haría que los compuestos hidrofóbicos tengan favorecida su absorción. Esto, sumado al uso de mayores volúmenes de buffer finales (250 μL vs. 100 μL), provocaría que la concentración real en el interior de los organismos, en particular para moléculas altamente hidrofóbicas, sea superior en los peces con respecto a los gusanos.

Tabla 10: Evaluación de las actividades de las fracciones positivas frente a larvas de zebrafish. Peces 96 hpf fueron incubados con las fracciones a una concentración de 1, 0,1 y 0,01 por 24 horas. La viabilidad se determinó mediante observación de presencia del latido del corazón bajo lupa.

Fracción	Viabilidad de zebrafish (%)		
	0,01 $\mu\text{gE}/\mu\text{L}$	0,1 $\mu\text{gE}/\mu\text{L}$	1 $\mu\text{gE}/\mu\text{L}$
1	100	100	0
2	100	100	100
3	100	100	0
4	100	100	100
5	100	17	0
6	100	0	0
7	100	100	0

Con la información obtenida en los ensayos con *C. elegans*, *Haemonchus* spp. y zebrafish se eligieron las fracciones 2,3,5 y 6 como las más prometedoras. Las fracciones 3, 5 y 6 son las más activas, siendo las dos últimas sumamente activas contra *C. elegans* y *Haemonchus* spp., aunque también las más tóxicas frente a zebrafish. Por otro lado, la fracción 2 tiene una actividad nematocida más moderada, pero es sumamente más inocua frente a peces, por lo que su margen de seguridad podría ser mayor.

El próximo paso a seguir será la dilucidación estructural de los compuestos de las cuatro fracciones elegidas, para luego poder identificar la molécula activa en cada uno de ellos. La dilucidación estructural será realizada por la Griffith University a la brevedad. Hasta el momento se cuenta con información de NMR (Fig. 12). De acuerdo a la misma, es posible hipotetizar que las fracciones 3, 5 y 6 contengan principios activos similares (familia química compartida).

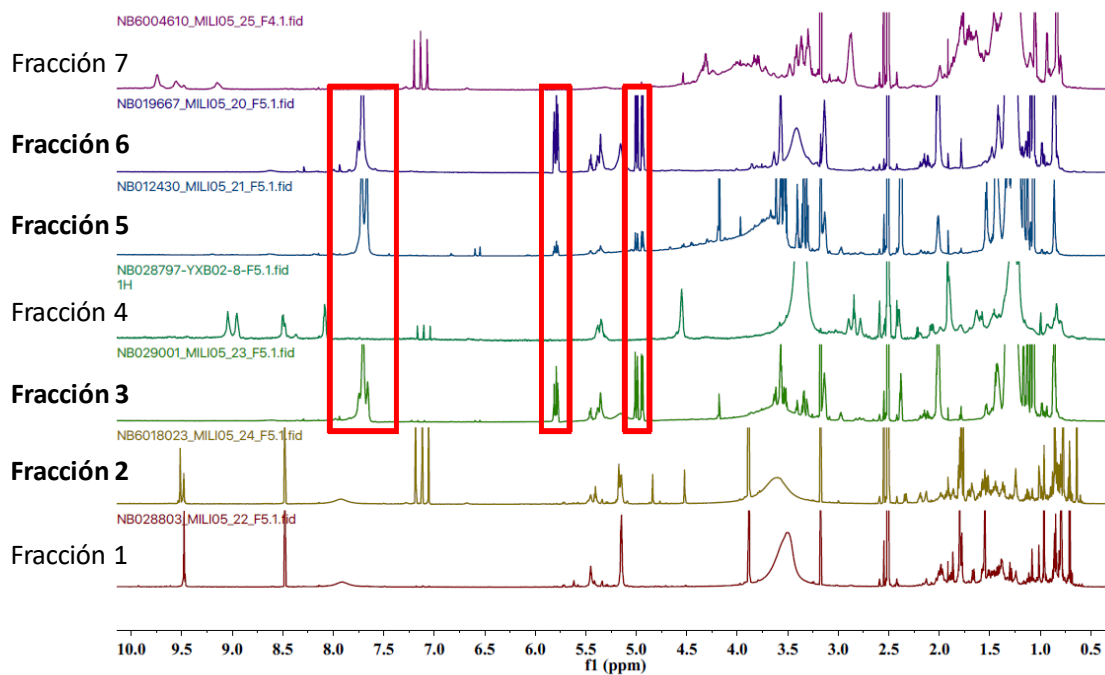


Figura 12: Picos de NMR de las fracciones positivas provistos por la Griffith University.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE 3: BÚSQUEDA DE NUEVOS BLANCOS NEMATICIDAS

Como tercer etapa se propuso la búsqueda de genes de nemátodos que puedan ser potenciales blancos nematicidas. Con este objetivo, se realizó una búsqueda bibliográfica con la herramienta bioinformática BioMart. Se seleccionaron aquellos genes presentes tanto en *C. elegans* como en nemátodos parásitos (*Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Strongyloides papillosus*), pero ausentes en vertebrados (humano y zebrafish). De esta forma se seleccionaron 1145 genes, siendo evaluados 768 de los mismos (Tabla anexa 1). Los organismos utilizados como filtro fueron elegidos buscando que los genes evaluados sean compartidos por todo el filo *Nematoda*, pero que no estén presentes en los hospederos vertebrados. De esta forma, se espera encontrar blancos farmacológicos nematicidas de amplio espectro, pero con una baja o nula toxicidad sobre vertebrados.

A continuación, se realizó el ensayo de comportamiento de tipo “*burrowing*”, anteriormente explicado, con el nematodo de vida libre *C. elegans* (Fig. 6). Para poder determinar la esencialidad de los genes seleccionados en este proceso, se llevó a cabo un cribado con una biblioteca de ARNi (utilizando los genes seleccionados). El ensayo permitió distinguir gusanos con o sin el vigor neuromuscular suficiente para ser capaces de atravesar barreras físicas, escenarios más similares a los que se enfrentan los gusanos parásitos que las placas de Petri. Los gusanos que no alcanzaron la superficie fueron aquellos que tuvieron afectada la expresión de un gen esencial o necesario para la excavación. Así, 59 genes fueron identificados como positivos, casi un 7,7% de los evaluados (Tabla 11).

Tabla 11: Lista de genes identificados como positivos en el ensayo de ARNi.

F32B5.1	C30G12.4	C13B9.4	K08B4.4
F32B5.7	R07G3.2	R13F6.9	K08B4.6
F47B3.7	F18A1.7	B0280.11	T22D1.3
F28H1.3	E01G4.3	F08F8.4	C34D4.15
C34G6.6	F33A8.10	C07H6.2	C42D4.3
T27A3.3	H10E21.4	ZK112.2	F42C5.9
ZC328.1	K02F3.5	C02C2.1	D2096.6
W01A8.3	K02F3.8	C29E4.5	F42A9.2

ZC434.3	K02F3.10	C14B9.3	F52B11.3
W03G9.7	T24C4.6	F42H10.5	Y41E3.1
C16C8.18	K01A11.4	K01B6.1	T02D1.4
F31D5.3	R74.4	R02D3.2	C06A12.3
ZK546.6	F09F7.1	B0212.1	C43F9.9
F09C12.7	F54E7.6	ZC416.4	M02B1.4
C44B7.10	B0336.1	C46G7.1	

Con esta información, se procedió buscando información bibliográfica de los genes identificados como positivos. Es así como se evidenció que la mayoría de los mismos (42,4% aproximadamente) son expresados en neuronas (Fig. 13). Esto representa un claro enriquecimiento en genes neuronales; considerando que se estima que un 15-20% del genoma de *C. elegans* es expresado en neuronas.

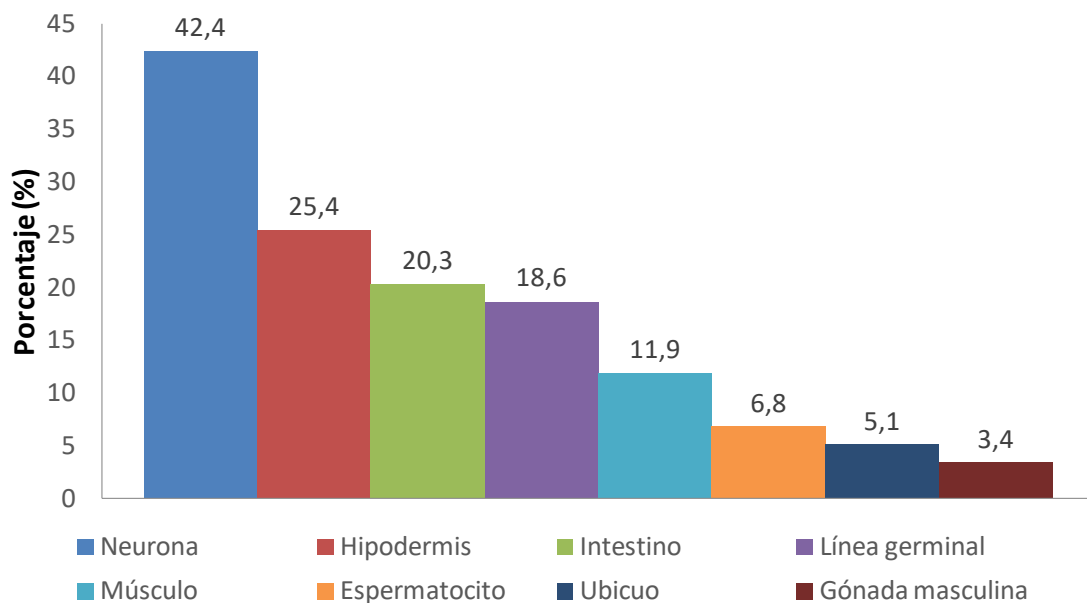


Figura 13: Localización de la expresión de los genes positivos. La mayoría de los genes identificados como positivos presentan expresión neuronal.

El siguiente paso consistiría en elegir los genes más promisorios sobre los cuales avanzar. En este sentido, hay buenos candidatos. El gen C13B9.4 codifica para un receptor acoplado a proteínas G esencial para la locomoción. Otro candidato interesante es C43F9.9, un canal iónico de glutamato. Por otro lado, fueron identificados genes que codifican para enzimas tirosina fosfatasas y MAP quinasas como F47B3.7 y ZC416.4 respectivamente. Además, K01A11.4 codifica para un canal de calcio. Por último, se identificó un gen que codifica para un

receptor que modula la sensibilidad a levamisol, F09F7.1. Como se puede apreciar, mediante el cribado fueron identificados varios potenciales blancos nematocidas prometedores.

7. DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

Los nematodos parásitos afectan en gran medida la salud humana y animal. Su control es usualmente llevado a cabo con la aplicación de varios fármacos. Lamentablemente, se ha reportado resistencia frente a los fármacos utilizados; principalmente en nematodos que infectan ovinos. La resistencia a los nematicidas se ha transformado en un problema acuciante para la producción ovina. Ante esta problemática, el desarrollo de nuevas drogas es de primera necesidad.

Una aproximación inicial a esta problemática podría ser la utilización de gusanos parásitos para realizar cribados de moléculas potencialmente nematicidas. Sin embargo, el manejo de estos organismos es complejo y es sumamente dificultoso obtenerlos en grandes cantidades como para estrategias del tipo *high-throughput*. Por otro lado, el nematodo modelo de vida libre *C. elegans* aparece como una posible alternativa. Su ciclo de vida puede ser completado en el laboratorio en 3 días, obteniéndose grandes números de gusanos en poco tiempo. Además se cuenta con una enorme cantidad de bibliografía sobre el mismo, siendo esta información considerablemente mayor a la de cualquier otro nematodo.

No obstante, una de sus mayores ventajas podría ser también su mayor desventaja: no es un nematodo parásito. Fue, esencialmente por esta razón, que no ha sido utilizado en mayor medida para la búsqueda de drogas nematicidas. Existe el riesgo de que algunas moléculas pudieran ser activas frente a *C. elegans* pero no frente a nematodos parásitos o viceversa. De todas formas, esta limitante está siendo actualmente relativizada. Estudios genéticos han demostrado que no hay mayores diferencias entre *C. elegans* y nematodos parásitos de las que hay entre especies de nematodos parásitos entre sí. Además, cribados a gran escala demostraron que aproximadamente la mitad de las moléculas activas frente a *C. elegans* también lo son frente a otros gusanos parásitos; lo que es más que suficiente al haberse aprovechado todas las ventajas del uso del gusano modelo. En línea con estos resultados, también es importante señalar que la mayoría de los nematicidas que fueron o son usados como fármacos, son activos frente a *C. elegans*. De hecho, la mayoría de los blancos farmacológicos de los mismos fueron descubiertos en *C. elegans*. Además, es importante mencionar que los principales nematodos parásitos gastrointestinales del ganado (*Haemonchus contortus*, *Cooperia* spp. y *Ostertagia* spp.) son del clado V, el mismo clado al que pertenece *C. elegans*. Por esta razón, *C. elegans* es un modelo filogenéticamente cercano a estos organismos parásitos.

Son estas ventajas las que permiten proponer el empleo de *C. elegans* para las primeras etapas de cribado de moléculas, de modo de utilizarlo de filtro. Así, el número de compuestos a luego ser evaluados en los verdaderos gusanos parásitos se reduce en gran medida, pero casi sin perder potenciales positivos. De esta forma, se puede minimizar la cantidad de nematodos parásitos necesarios para el proceso de descubrimiento de drogas, con sus respectivos beneficios tanto a nivel de simplicidad como de costos y tiempo.

Con respecto a este trabajo en particular, sería muy interesante avanzar con los resultados de cada una de las secciones. Por un lado, la información de *scaffolds* obtenida en la primera parte podría derivar en seguir evaluando moléculas similares y derivadas para encontrar aquellas con una máxima actividad. Además, se podría probar su acción sobre parásitos y, luego de estudiada su toxicidad, en infecciones experimentales. Por el lado de la segunda sección, es sumamente intrigante conocer la estructura de los compuestos activos en los extractos (información con la que esperamos contar a la brevedad). Luego, se podrá buscar la optimización de las estructuras activas de forma de mejorar su potencia y reducir su toxicidad. Por otra parte, con la información de las estructuras sería posible evaluar la factibilidad de su síntesis química. A futuro, también se podría evaluar su actividad en infecciones e identificar sus blancos moleculares realizando mutagénesis en *C. elegans*. Por último, con los resultados de la tercera sección se podrá avanzar en el estudio de los genes más promisorios anteriormente detallados. Una siguiente etapa podría ser expresar en *E. coli* las proteínas que dichos genes codifican para posteriormente estudiar su estructura y su posible inhibición. Asimismo, se podrá explorar realizar la interferencia de los genes positivos en algún modelo de nematodo parásito.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stepek, G., Buttle, D. J., Duce, I. R. & Behnke, J. M. Human gastrointestinal nematode infections: Are new control methods required? *Int. J. Exp. Pathol.* **87**, 325–341 (2006).
2. Keiser, J. & Utzinger, J. The Drugs We Have and the Drugs We Need Against Major Helminth Infections. in *Advances in parasitology* **73**, 197–230 (2010).
3. Lo, N. C. *et al.* A call to strengthen the global strategy against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: the time is now. *Lancet Infect. Dis.* **17**, e64–e69 (2017).
4. Perry, B. . & Randolph, T. . Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Vet. Parasitol.* **84**, 145–168 (1999).
5. Kaplan, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report. *Trends Parasitol.* **20**, 477–481 (2004).
6. Atkinson, H. J., Lilley, C. J. & Urwin, P. E. Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 251–256 (2012).
7. Buzatti, A. *et al.* *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Exp. Parasitol.* **159**, 1–4 (2015).
8. Vercruyse, J. *et al.* Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **1**, 14–27 (2011).
9. Besier, B. New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends Parasitol.* **23**, 21–24 (2007).
10. Sutherland, I. A. & Leathwick, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol.* **27**, 176–181 (2011).
11. Conway, D. P. Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am. J. Vet. Res.* **25**, 844–6 (1964).
12. Drudge, J. H., Szanto, J., Wyant, Z. N. & Elam, G. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine. *Am. J. Vet. Res.* **25**, 1512–8 (1964).
13. 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**, 106–10 (1979).

14. Chapman, M. R., French, D. D., Monahan, C. M. & Klei, T. R. Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population. *Vet. Parasitol.* **66**, 205–12 (1996).
15. van Wyk, J. . . & Malan, F. S. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet. Rec.* **123**, 226–8 (1988).
16. Boersema, J. H., Eysker, M. & Nas, J. W. M. Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet. Rec.* **150**, 279–81 (2002).
17. Watson, T. G., Hosking, B. C., Leathwick, D. M. & McKee, P. F. Ivermectin-moxidectin side resistance by *Ostertagia* species isolated from goats and passaged to sheep. *Vet. Rec.* **138**, 472–3 (1996).
18. Leathwick, D. M. A case of moxidectin failing to control ivermectin resistant *Ostertagia* species in goats. *Vet. Rec.* **136**, 443–4 (1995).
19. Nari, A., Salles, J., Gil, A., Waller, P. J. & Hansen, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. *Vet. Parasitol.* **62**, 207–212 (1996).
20. Bonino, J. & Mederos, A. Resistencia antihelmíntica en ovinos. *Plan Agropecu.* **107**, 42–44 (2003).
21. Mederos, América; Carracelas, Beatriz; Lara, Stephanie; Pimentel, Sabrina; Banchemo, G. Situación actual de la resistencia a las drogas antihelmínticas en ovinos en Uruguay. *Rev. INIA* (2016).
22. Scott, I. *et al.* Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* **198**, 166–171 (2013).
23. Geary, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol.* **21**, 530–2 (2005).
24. Geary, T. G., Sangster, N. C. & Thompson, D. P. Frontiers in anthelmintic pharmacology. *Vet. Parasitol.* **84**, 275–95 (1999).
25. Holden-Dye, L. & Walker, R. J. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, ed. C. *elegans Res. Community*, *WormBook*. 2014 doi:10.1895/wormbook.1.1
26. GORDON, H. M. Thiabendazole: a highly effective anthelmintic for sheep. *Nature* **191**, 1409–10 (1961).
27. Lacey, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. today* **6**, 112–5 (1990).

28. Driscoll, M., Dean, E., Reilly, E., Bergholz, E. & Chalfie, M. Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity. *J. Cell Biol.* **109**, 2993–3003 (1989).
29. Kwa, M. S., 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).
30. Kwa, M. S. G., Veenstra, J. G., Van Dijk, M. & Roos, M. H. β -Tubulin Genes from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus* Modulate Drug Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **246**, 500–510 (1995).
31. Aubry, M. L., Cowell, P., Davey, M. J. & Shevde, S. Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic: pyrantel. *Br. J. Pharmacol.* **38**, 332–44 (1970).
32. Aceves, J., Erlj, D. & Martínez-Marañón, R. The mechanism of the paralysing action of tetramisole on *Ascaris* somatic muscle. *Br. J. Pharmacol.* **38**, 602–7 (1970).
33. 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).
34. Qian, H., Martin, R. J. & Robertson, A. P. 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).
35. Haber, C. L. *et al.* Development of a mechanism of action-based screen for anthelmintic microbial metabolites with avermectinlike activity and isolation of milbemycin-producing *Streptomyces* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1811–7 (1991).
36. Pemberton, D. J., Franks, C. J., Walker, R. J. & Holden-Dye, L. Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl- α 2 in the function of the native receptor. *Mol. Pharmacol.* **59**, 1037–43 (2001).
37. Kass, I. S., Wang, C. C., Walrond, J. P. & Stretton, A. O. Avermectin B1a, a paralyzing anthelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in *Ascaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6211–5 (1980).
38. Krause, R. M. *et al.* Ivermectin: a positive allosteric effector of the α 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* **53**, 283–94 (1998).
39. Bokisch, A. J. & Walker, R. J. The action of Avermectin (MK 936) on identified central neurones from *Helix* and its interaction with acetylcholine and gamma-aminobutyric acid (GABA) responses. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **84**, 119–25 (1986).

40. Holden-Dye, L. & Walker, R. J. Avermectin and avermectin derivatives are antagonists at the 4-aminobutyric acid (GABA) receptor on the somatic muscle cells of *Ascaris*; is this the site of anthelmintic action? *Parasitology* **101 Pt 2**, 265–71 (1990).
41. Zheng, Y. *et al.* Identification of Two Novel *Drosophila melanogaster* Histamine-gated Chloride Channel Subunits Expressed in the Eye. *J. Biol. Chem.* **277**, 2000–2005 (2002).
42. Shan, Q., Haddrill, J. L. & Lynch, J. W. Ivermectin, an Unconventional Agonist of the Glycine Receptor Chloride Channel. *J. Biol. Chem.* **276**, 12556–12564 (2001).
43. Khakh, B. S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V, Labarca, C. & Lester, H. A. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J. Neurosci.* **19**, 7289–99 (1999).
44. Cully, D. F. *et al.* Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **371**, 707–711 (1994).
45. Salinas, G. & Risi, G. *Caenorhabditis elegans*: nature and nurture gift to nematode parasitologists. *Parasitology* **145**, 979–987 (2018).
46. Félix, M.-A. RNA interference in nematodes and the chance that favored Sydney Brenner. *J. Biol.* **7**, 34 (2008).
47. Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans* (June 18, 2015), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.177.1, <http://www.wormbook.org>. doi:10.1534/genetics.115.176099
48. Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**, 110–56 (1977).
49. Kimble, J. & Hirsh, D. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **70**, 396–417 (1979).
50. Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. & Thomson, J. N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **100**, 64–119 (1983).
51. White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. & Brenner, S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **314**, 1–340 (1986).
52. Jarrell, T. A. *et al.* The connectome of a decision-making neural network. *Science* **337**, 437–44 (2012).
53. *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a

- platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012–8 (1998).
54. Kaletta, T. & Hengartner, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 387–399 (2006).
 55. Culetto, E. & Sattelle, D. B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 869–77 (2000).
 56. Raizen, D. M. *et al.* Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature* **451**, 569–572 (2008).
 57. Hu, P. J. Dauer (August 08, 2007), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.144.1, doi:10.1895/wormbook.1.144.1
 58. Schulenburg, H. & Félix, M.-A. The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **206**, 55–86 (2017).
 59. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
 60. Chalfie, M. & Sulston, J. Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **82**, 358–70 (1981).
 61. Hedgecock, E. M., Sulston, J. E. & Thomson, J. N. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **220**, 1277–9 (1983).
 62. Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., Hall, D. H. & Stern, B. D. Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **100**, 365–82 (1987).
 63. Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. & Tabtiang, R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461–464 (1993).
 64. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–54 (1993).
 65. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–5 (1994).
 66. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
 67. Félix, M.-A. *et al.* Natural and Experimental Infection of *Caenorhabditis* Nematodes by Novel Viruses Related to Nodaviruses. *PLoS Biol.* **9**, e1000586 (2011).
 68. Simpkin, K. G. & Coles, G. C. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **31**, 66–69 (1981).

69. Blaxter, M. *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* **282**, 2041–6 (1998).
70. Thompson, O. *et al.* The million mutation project: A new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* **23**, 1749–1762 (2013).
71. Hutter, H. & Moerman, D. Big Data in *Caenorhabditis elegans*: quo vadis? *Mol. Biol. Cell* **26**, 3909–14 (2015).
72. Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**, 3959–70 (1991).
73. Blaxter, M. L. *et al.* A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* **392**, 71–75 (1998).
74. Wylie, T. *et al.* Nematode.net: a tool for navigating sequences from parasitic and free-living nematodes. *Nucleic Acids Res.* **32**, 423D–426 (2004).
75. Parkinson, J. *et al.* A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. *Nat. Genet.* **36**, 1259–1267 (2004).
76. Kaminsky, R. *et al.* A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* **452**, 176–180 (2008).
77. Geary, T. G. & Thompson, D. P. *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Vet. Parasitol.* **101**, 371–86 (2001).
78. Mitreva, M., Blaxter, M., Bird, D. & McCarter, J. Comparative genomics of nematodes. *Trends Genet.* **21**, 573–581 (2005).
79. Lindblom, T. H. & Dodd, A. K. Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* **305A**, 720–730 (2006).
80. Burns, A. R. & Roy, P. J. To Kill a Mocking Worm: Strategies to Improve *Caenorhabditis elegans* as a Model System for use in Anthelmintic Discovery. in *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*. 201–216 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012). doi:10.1002/9783527652969.ch12
81. Burns, A. R. *et al.* *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
82. 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).
83. Ferreira, S. R. *et al.* A new methodology for evaluation of nematode viability. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).

84. 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).
85. Weaver, K. J., May, C. J. & Ellis, B. L. Using a health-rating system to evaluate the usefulness of *Caenorhabditis elegans* as a model for anthelmintic study. *PLoS One* **12**, e0179376 (2017).
86. 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**, 226–32 (2014).
87. Sloan, M. A., Reaves, B. J., Maclean, M. J., Storey, B. E. & Wolstenholme, A. J. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits from parasitic nematodes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **204**, 44–50 (2015).
88. Duguet, T. B. *et al.* Recent Duplication and Functional Divergence in Parasitic Nematode Levamisole-Sensitive Acetylcholine Receptors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004826 (2016).
89. Wever, C. M., Farrington, D. & Dent, J. A. The Validation of Nematode-Specific Acetylcholine-Gated Chloride Channels as Potential Anthelmintic Drug Targets. *PLoS One* **10**, e0138804 (2015).
90. Takenaka, T. Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. *BJU Int.* **88 Suppl 2**, 7–10 (2001).
91. Daniel H. Lin, Stephan Zimmermann, Tobias Stuwe, Evelyn Stuwe, and A. H. D. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today* **425**, 1318–1329 (2013).
92. Segel, I. H. *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems.* (Wiley, 1975).
93. Foreman, J. C., Johansen, T. & Gibb, A. J. *Textbook of receptor pharmacology.* (CRC Press, 2011).
94. Nambi, P. & Aiyar, N. G Protein-Coupled Receptors in Drug Discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* **1**, 305–310 (2003).
95. Imming, P., Sinning, C. & Meyer, A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 821–834 (2006).
96. Rask-Andersen, M., Almén, M. S. & Schiöth, H. B. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 579–590 (2011).
97. Diller, D. J. The synergy between combinatorial chemistry and high-throughput

- screening. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **11**, 346–55 (2008).
98. Takenaka, T. Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. *BJU Int.* **88 Suppl 2**, 7-10; discussion 49-50 (2001).
 99. Swinney, D. C. & Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 507–519 (2011).
 100. Arrowsmith, J. Phase III and submission failures: 2007–2010. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 87–87 (2011).
 101. Arrowsmith, J. Phase II failures: 2008–2010. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 328–329 (2011).
 102. Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 993–996 (2006).
 103. Pina, A. S., Hussain, A. & Roque, A. C. A. An Historical Overview of Drug Discovery. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **572**, 3–12 (2009).
 104. Vogt, A. & Lazo, J. S. Chemical complementation: A definitive phenotypic strategy for identifying small molecule inhibitors of elusive cellular targets. *Pharmacol. Ther.* **107**, 212–221 (2005).
 105. Yuan, H. *et al.* Use of Reprogrammed Cells to Identify Therapy for Respiratory Papillomatosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1220–1227 (2012).
 106. Giacomotto, J. & Ségalat, L. High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br. J. Pharmacol.* **160**, 204–16 (2010).
 107. Gregori-Puigjané, E. *et al.* Identifying mechanism-of-action targets for drugs and probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 11178–83 (2012).
 108. Vane, J. R. & Botting, R. M. The mechanism of action of aspirin. *Thromb. Res.* **110**, 255–8 (2003).
 109. Drewry, D. H. & Macarron, R. Enhancements of screening collections to address areas of unmet medical need: an industry perspective. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 289–298 (2010).
 110. Nielsen, T. E. & Schreiber, S. L. Towards the optimal screening collection: a synthesis strategy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 48–56 (2008).
 111. Matson, S. L. *et al.* Best practices in compound management for preserving compound integrity and accurately providing samples for assays. *J. Biomol. Screen.* **14**, 476–84 (2009).

112. Davis, A. M., Keeling, D. J., Steele, J., Tomkinson, N. P. & Tinker, A. C. Components of successful lead generation. *Curr. Top. Med. Chem.* **5**, 421–39 (2005).
113. Monge, A., Arrault, A., Marot, C. & Morin-Allory, L. Managing, profiling and analyzing a library of 2.6 million compounds gathered from 32 chemical providers. *Mol. Divers.* **10**, 389–403 (2006).
114. Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 215–34 (2000).
115. Luo, Y., Cobb, R. E. & Zhao, H. Recent advances in natural product discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **30**, 230–237 (2014).
116. Butler, M. S., Robertson, A. A. B. & Cooper, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 1612–61 (2014).
117. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75**, 311–35 (2012).
118. Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* **13**, 894–901 (2008).
119. Rishton, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *Am. J. Cardiol.* **101**, 43D–49D (2008).
120. McChesney, J. D., Venkataraman, S. K. & Henri, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* **68**, 2015–2022 (2007).
121. Ortholand, J. Y. & Ganesan, A. Natural products and combinatorial chemistry: Back to the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 271–280 (2004).
122. Ganesan, A. Recent developments in combinatorial organic synthesis. *Drug Discov. Today* **7**, 47–55 (2002).
123. Rosén, J., Gottfries, J., Muresan, S., Backlund, A. & Oprea, T. I. Novel chemical space exploration via natural products. *J. Med. Chem.* **52**, 1953–62 (2009).
124. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3670–3695 (2013).
125. Breinbauer, R., Vetter, I. R. & Waldmann, H. From protein domains to drug candidates- natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 2879–90 (2002).
126. Raskin, I. *et al.* Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* **20**, 522–31 (2002).

127. Newman, D. J. & Hill, R. T. New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 539–44 (2006).
128. Andersen, R. J. Sponging off nature for new drug leads. *Biochem. Pharmacol.* **139**, 3–14 (2017).
129. Gordon, E. M., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. & Gallop, M. A. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. *J. Med. Chem.* **37**, 1385–401 (1994).
130. Gallop, M. A., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. & Gordon, E. M. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J. Med. Chem.* **37**, 1233–51 (1994).
131. Zajdel, P., Pawłowski, M., Martinez, J. & Subra, G. Combinatorial chemistry on solid support in the search for central nervous system agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **12**, 723–39 (2009).
132. Sun, H., Liu, Z., Zhao, H. & Ang, E. L. Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 823–833 (2015).
133. Liu, R., Li, X. & Lam, K. S. Combinatorial chemistry in drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **38**, 117–126 (2017).
134. Barn, D. *et al.* Design and Synthesis of a Maximally Diverse and Druglike Screening Library Using REM Resin Methodology. *J. Comb. Chem.* **3**, 534–541 (2001).
135. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26 (2001).
136. Camp, D., Davis, R. A., Campitelli, M., Ebdon, J. & Quinn, R. J. Drug-like Properties: Guiding Principles for the Design of Natural Product Libraries. *J. Nat. Prod.* **75**, 72–81 (2012).
137. 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).
138. Kumarasingha, R. *et al.* Enhancing a search for traditional medicinal plants with anthelmintic action by using wild type and stress reporter *Caenorhabditis elegans* strains as screening tools. *Int. J. Parasitol.* **44**, 291–298 (2014).
139. Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* (2006). doi:10.1895/wormbook.1.101.1

140. Bichara, D., Calcaterra, N. B., Arranz, S., Armas, P. & Simonetta, S. H. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. *J. Appl. Toxicol.* **34**, 214–219 (2014).
141. Álvarez, G. *et al.* Multi-Anti-Parasitic Activity of Arylidene Ketones and Thiazolidene Hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Molecules* **22**, 709 (2017).

9. ANEXO

Tabla suplementaria 1: Genes estudiados en el ensayo de ARNi. Los genes fueron seleccionados utilizando la herramienta bioinformática Biomart, eligiendo aquellos que *C. elegans* comparte con los nemátodos parásitos *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Strongyloides papillosus*, pero no con vertebrados como el ser humano y zebrafish.

W04C9.5	C36B1.10	T23F4.2	K01C8.6	C09F5.1	F08F8.4	T07A9.3	F38E11.3
ZC123.1	DY3.2	F56D12.5	C26D10.5	B0412.2	T20B12.2	C18H7.2	F38E11.4
F54A5.2	DY3.5	F22E5.1	M05D6.5	K02F3.5	T20B12.9	K11H12.6	C33A12.6
F23C8.8	F36A2.3	Y25C1A.13	M05D6.6	K02F3.8	K07D8.1	K11H12.7	F56H11.4
T16H5.1	F36A2.4	C17F4.3	T13H5.2	K02F3.10	C07H6.2	F56B3.2	ZK1251.6
C55C2.2	F55H12.1	F02E11.1	W01C9.3	T24C4.6	ZK112.2	F56B3.4	ZK1251.8
F32B5.1	F55H12.4	C16C8.18	W01C9.5	M01E10.2	C08C3.4	F58H7.1	H27C11.1
F32B5.7	C31H5.1	W09G10.1	F54C9.4	H19M22.2	C02C2.1	F58H7.3	T13F2.7
W03D8.6	ZK858.5	W10G11.16	F54C9.8	H19M22.3	ZK688.6	C44B12.1	T13F2.10
W10C8.5	F36H2.3	F53C3.1	T22C8.6	R148.6	C29E4.1	F58F6.1	T13F2.11
M01B12.4	F14B4.1	K10G6.2	T22C8.8	F59A2.2	C29E4.4	R05C11.1	K07F5.1
W05F2.4	C17E4.6	W06A11.1	T01B7.7	K01A11.4	C29E4.5	C45G7.4	K07F5.2
T03F1.11	F46A9.3	F31D5.3	F46C5.2	C34C12.3	C14B9.3	C45G7.5	K07F5.3
C50F2.8	F30A10.10	C01F1.4	T07D4.1	F34D10.6	ZC262.1	T26C12.3	K07F5.9
F47B3.1	C36F7.5	C01F1.5	B0457.2	C44F1.1	ZC262.3	T26C12.4	K07F5.11
F47B3.2	F42H11.1	B0286.5	T21B10.1	C44F1.5	R05D3.5	F42A6.9	F32B6.6
F47B3.3	C03D6.4	ZK430.3	C18E9.4	ZK1058.9	R05D3.9	Y55H10A.1	C47E12.6
F47B3.6	F26E4.4	F41C3.8	C18E9.7	C36E8.2	ZK1236.5	C04C3.2	F44D12.5
F47B3.7	F26E4.6	F41C3.11	F44G4.8	C16C10.1	F42H10.5	F09D12.1	F44D12.7
F28H1.3	F26E4.7	F26G1.7	T24B8.4	C16C10.12	F22B7.7	B0212.1	W01B6.6
F28H1.4	K10C3.3	C33F10.5	T24B8.6	R74.4	B0523.5	ZC416.4	C04G2.4
C09D1.1	T23H4.3	C33F10.7	T26C5.2	R10E4.11	ZK370.6	F37C4.4	C04G2.7
R12E2.5	F52F12.4	C33F10.9	F42A8.1	B0285.7	F44E2.4	K06B9.5	K08F4.8
C43E11.4	C03C11.1	R05F9.3	F42A8.3	R07E5.4	ZK643.3	F29B9.11	T14G10.7
D1007.14	Y106G6D.5	R05F9.8	C06C3.4	R07E5.7	F54G8.4	T22B11.5	K04D7.4
B0041.3	Y106G6D.6	R05F9.13	C06C3.9	F56F3.1	T23G5.6	E03H12.10	F01G10.8
W09C3.1	Y106G6D.7	ZK546.6	M176.3	F56F3.2	K01B6.1	T28H11.1	F01G10.10
C10H11.3	F16C3.2	F59A6.5	ZK1307.1	M88.2	B0464.4	T28H11.5	Y43C5A.2
C10H11.5	Y106G6E.1	F33G12.6	ZK1307.7	M88.4	C15H7.3	T28H11.6	R10H10.4
C10H11.6	Y106G6G.2	F09C12.7	Y53C12A.2	F10F2.3	T05G5.2	C09B9.6	F13B12.2
M04F3.3	F37D6.6	ZK622.4	C08H9.3	F10F2.4	R10E11.4	R13H9.2	R13.2
W03G9.7	F25H2.13	C18A3.8	C05C10.2	T23F11.1	R10E11.6	R13H9.4	Y69E1A.5
F54C1.7	B0511.1	C33B4.2	C18D1.1	T04A8.9	ZK632.10	C02B10.6	Y5F2A.1
F56A3.3	F49D11.9	ZK673.7	C18D1.2	F17C8.2	K03H1.5	C24D10.1	B0035.13
C32E12.3	F32B4.1	W02B8.5	F33H1.4	B0393.3	R10E12.2	C24D10.6	B0035.15
C32E12.4	R05D7.3	K10H10.10	T01E8.1	B0393.5	C05B5.4	F36H12.7	H02112.3
C01G8.2	F41D3.9	F35D11.5	C07E3.4	F26A1.4	T16G12.5	F36H12.10	C10C6.5

F48C1.6	T09E11.6	F21H12.5	C07E3.9	F01F1.3	T16G12.6	ZK354.1	M04B2.1
F27C1.13	T09E11.8	C52A11.2	M28.1	H14E04.1	T16H12.6	ZK354.4	M04B2.5
F59A3.1	T09E11.9	F15A4.11	M28.7	Y22D7AL.14	T16H12.9	ZK354.5	F12F6.9
F55F8.6	T15D6.9	F33A8.10	C09G5.8	T19C3.2	ZK1128.7	ZK354.11	F58B3.1
T19B4.1	T27F6.1	ZK84.2	C52A11.2	C18D11.1	T07C4.5	Y4C6B.5	F58B3.2
F56H1.5	T07D10.2	F58A6.8	F44F4.2	Y48A6C.4	T07C4.9	T11F8.4	ZK809.1
F33D11.5	B0019.1	C34F11.4	F40F8.7	Y66D12A.24	C38H2.2	B0273.2	ZK809.7
C34G6.2	Y18D10A.8	C34F11.6	F40F8.8	C35D10.11	M03C11.5	C55C3.5	ZK792.4
C34G6.6	C47B2.8	F08B1.2	T06D8.10	F26F4.7	F43D9.1	H35B03.1	K01A6.6
B0207.2	W05B5.2	EEED8.10	T05B9.2	C45G9.5	Y45F3A.3	C10G6.1	H01G02.1
C06A5.3	ZK1225.1	T25E4.1	C47G2.1	ZC155.1	Y39A1A.13	H04M03.4	F38H4.6
T27A3.3	ZK1225.2	F59E12.2	T24F1.6	ZC395.10	K01G5.6	C46G7.1	C29E6.1
T09B4.4	Y6B3B.4	C18A3.4	B0491.5	F52C9.5	K11D9.3	C46G7.2	ZK829.7
T09B4.7	W09G3.1	C18A3.8	VW02B12L.2	F52C9.7	C44B9.5	C46G7.4	ZK829.9
C48E7.1	W04A8.6	K05F1.7	VF13D12L.3	W03A5.7	M142.2	K08B4.3	T12G3.2
C10G11.8	C37A5.9	ZK1248.6	T27D12.1	T24G10.2	Y48A6B.7	K08B4.4	C25G4.6
K04F10.4	Y54E5A.4	ZK1248.16	K12D12.2	F48E8.3	Y48A6C.4	K08B4.6	C25G4.10
ZC328.1	K05C4.11	H41C03.3	Y57A10C.6	D1044.2	Y56A3A.28	C49A9.8	C27D8.1
ZC328.2	K11B4.1	ZK84.2	F58G1.5	F09F7.1	Y75B8A.5	C17H12.3	T23F6.2
F37E3.2	ZK270.1	R12C12.9	Y38F1A.10	F56D2.1	Y75B8A.6	C17H12.5	C36H8.2
C55B7.10	ZK337.2	F21H12.5	F18A11.1	C05D2.3	Y37D8A.15	C17H12.11	ZK896.9
T10E9.3	F33H2.8	C29H12.3	F18A11.2	C05D2.4	ZK1010.1	T05A12.3	F49E11.3
F57B10.3	F31C3.6	F40H3.1	F18A11.5	F54E7.6	ZK1010.7	T22D1.3	C39E9.8
F57B10.11	Y44E3A.2	F13H8.5	F29C12.1	B0336.1	ZK1010.9	C25A8.4	B0564.1
D2092.4	Y65B4BR.3	C29F5.1	E01G4.3	B0244.8	Y39E4B.8	C06G3.10	B0564.7
ZC581.9	D2005.6	C29F5.3	F54F11.1	R12B2.1	Y43F4A.1	ZC477.1	JC8.8
F08B6.4	T09E11.6	C29F5.4	W02B8.2	R12B2.5	F53A2.1	C34D4.1	W02A2.1
T21G5.4	ZC434.3	C29F5.7	Y39G8C.2	F01F1.4	F53A2.6	C34D4.15	W02A2.3
C30F12.5	W03G9.7	C32D5.2	Y48B6A.8	F01F1.5	F45G2.5	C42D4.3	K09B11.10
W01A8.1	T09E11.9	C32D5.7	K10H10.2	C28H8.5	Y76A2A.2	R13A1.2	Y45F10A.2
W01A8.3	ZK1053.1	C32D5.12	C01G12.1	C28H8.6	Y76A2B.3	R13A1.8	Y45F10B.10
K10D3.4	Y23H5B.4	K10B2.3	C38C6.3	F25B5.4	T05D4.1	D2024.4	C08F11.8
K07G5.5	Y119C1B.9	T28D9.7	C38C6.6	ZK328.6	ZK525.2	D2024.8	T23G4.1
M05B5.2	E01A2.6	T19D12.9	K02B7.3	F42A10.6	ZK512.3	F42C5.7	Y37A1B.7
M05B5.6	Y37E3.4	T19D12.10	W01D2.5	F42A10.7	F56F3.1	F42C5.9	Y37A1B.11
F21C3.1	C27A12.10	C18H9.3	R05H10.1	C23G10.6	T27E9.9	T12B3.2	F52B11.3
F13G3.1	K07A1.16	C18H9.5	Y57A10A.18	C23G10.8	B0244.8	R05G6.1	R05A10.7
F07A5.1	F53B6.1	T14B4.6	T12C9.3	F47D12.1	F08F8.4	F32E10.3	F55B11.1
C15A11.3	ZK858.3	T14B4.7	2RSSE.1	F47D12.7	R144.12	F33D4.1	Y57G11C.31
T28F4.1	Y20F4.2	T14B4.9	E04D5.3	C56G2.3	C44B9.5	C46A5.3	Y41E3.1
T28F4.4	ZK337.5	C44B7.10	T13H5.2	C56G2.4	F34D10.6	T14A8.1	Y116A8C.37
C26C6.7	F27C1.8	B0252.1	Y62F5A.10	T26A5.1	Y39E4B.5	C55F2.2	C52D10.3
T25G3.1	C10H11.4	ZK1127.4	C32D5.7	C13B9.4	H10E21.2	F57H12.5	Y116A8B.5
D2030.10	F23F1.4	C27H5.3	B0334.6	R13F6.3	T05G5.2	F42G8.11	T28F3.9
F26A3.6	C23H3.2	E04F6.3	R05H10.7	R13F6.9	T28A8.1	K07H8.8	C49C3.1
F20G4.1	C50D2.1	C30G12.4	W07G1.3	K04C2.2	ZK643.1	K07H8.10	T02D1.4
C54G4.6	C50D2.6	F43E2.3	C29F5.3	F31E3.5	R144.11	F35H10.10	C06A12.3
K04G2.9	T01D1.2	ZK1290.6	C29F5.7	C06E8.5	Y54F10AM.11	F17E9.11	C06A12.5

F18C12.3	T01D1.3	F35D2.1	C32D5.12	F11H8.2	M01G5.6	D2096.6	F11E6.5
T28B8.2	K01A2.1	F35D2.2	F35D2.2	F11H8.3	ZK525.2	T01B11.5	C43F9.9
ZK265.6	K01A2.11	R07G3.2	H10E21.3	R01H2.3	Y47D3B.1	T01B11.7	M02B1.4
ZK265.7	C03H5.6	R07G3.3	H10E21.4	ZK418.4	B0361.4	C28C12.9	T12A7.6
ZK265.8	T27A1.4	F18A1.6	F40G9.11	ZK418.6	F29C4.1	C28C12.10	ZK550.3
T01G9.3	C09E8.2	F18A1.7	W07B3.2	ZK418.7	R02D3.2	F42A9.2	ZK822.1
F52B5.1	C09E8.3	T09A5.5	F30H5.3	B0280.11	T21D12.2	C49C8.5	F18F11.4
F52B5.2	W08F4.6	T01H3.3	T22F7.3	F37C12.12	T21D12.7	F08B4.2	Y37E11AR.5
F02E9.1	F46F5.10	DH11.5	T19C3.2	R151.5	K02D7.4	C09G9.3	C05C12.6
K02B12.5	R07C3.3	F10B5.3	T19C3.5	F56C9.3	F18F11.3	C53D6.7	H12I19.8
VF39H2L.1	T13B5.1	F10B5.4	W06E11.1	F56C9.7	F18F11.4	T20D3.6	F15E6.2