Practicando Final de Grado de la Carrera Licenciatura en Química

COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS EN FASE LÍQUIDA Y SÓLIDA PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DEL NEMATODO Caenorhabditis elegans A PRINCIPIOS ACTIVOS CON ACCIÓN NEMATICIDAS

DOCENTE TUTOR
Prof. Gustavo Salinas (Facultad de Química)
Prof. Gonzalo Suarez (Facultad de Veterinaria)

Natalia Maggiolo Suarez

Montevideo 2025

TABLA DE CONTENIDO

Marco Teórico 3
Objetivos generales 5
Objetivos específicos 5
Materiales y métodos 5
1. Desarrollo de la técnica de sensibilidad farmacológica 5
2. Reactivos y disoluciones 6
3. Equipamiento 6
4. Cultivo y mantenimiento de *C. elegans* 7
5. Ensayos 7
5.A Fase líquida 8
5.B Fase sólida 8
6. Análisis estadístico 9
RESULTADOS 9
DISCUSIÓN 15
CONCLUSIONES 17
BIOGRAFÍA 19
ANEXOS 21

1. MARCO TEÓRICO

Problemática de la resistencia parasitaria

En la actualidad los parásitos (helmintos) constituyen un problema sanitario y económico prevalente, en particular para los países en desarrollo [1]. El tratamiento farmacológico masivo del ganado contra la helmintiasis ha llevado a los productores a enfrentarse a la propagación acelerada de la resistencia antihelmíntica a todas las clases conocidas de antihelmínticos [2]. Este fenómeno ha sido documentado a nivel mundial, con múltiples factores contribuyendo a la resistencia, incluidos el uso frecuente e inadecuado de medicamentos, estrategias limitadas de tratamiento y la falta de prácticas de manejo sostenibles [3]. En particular, la resistencia se ha documentado en nematodos gastrointestinales de rumiantes pequeños, como *Haemonchus contortus*, que han desarrollado resistencia a múltiples clases de antihelmínticos, incluidas las benzimidazoles, levamisol e ivermectinas [4]. Este escenario ha hecho que la aplicación de tratamientos estándar se vuelva menos efectiva, conduciendo a crisis de producción y sostenibilidad a nivel de campo [5].

El problema de la resistencia se debe en parte a factores como el dosaje inadecuado, la falta de rotación en el uso de drogas y el uso preventivo constante sin un diagnóstico específico [3]. Además, el impacto de la resistencia ha llevado a una necesidad imperiosa de desarrollar pruebas moleculares avanzadas para identificar y monitorear con precisión la resistencia en el campo [6]. Ante esta situación, se ha enfatizado la importancia de adoptar estrategias integradas de manejo sostenible, que podrían incluir el uso 'inteligente' de medicamentos, mejor manejo del ganado, y la implementación de métodos no químicos como agentes de control biológico [4]. Las investigaciones actuales también apuntan a la necesidad de identificar nuevos candidatos a antihelmínticos que ofrecen modos de acción diferentes para abordar cepas resistentes [7]. Estos desafíos resaltan la relevancia en replantear la disponibilidad de herramientas que nos permitan identificar estrategias farmacológicas en el control de parásitos nematodos y desarrollar nuevas herramientas y métodos que optimicen la evaluación de los actuales antihelmínticos.

Modelo Caenorhabditis elegans

Caenorhabdítis elegans es un nematodo de vida libre que ha sido validado para el cribado de fármacos antihelmínticos [8]. A pesar de no ser un parásito, *C. elegans* es extremadamente útil para los parasitólogos de nematodos [9,10]. Además, se ha dilucidado el mecanismo de acción y la resistencia a varios antihelmínticos utilizando C. *elegans* [11]. Una de las limitantes del estudio experimental del potencial antihelmíntico

es la dificultad de trabajar con organismos parásitos. En este sentido, el nematodo de vida libre *C. elegans* es un modelo útil para entender el mecanismo de acción de las drogas antihelmínticas. Por un lado, este nematodo se puede mantener y manipular en laboratorio con facilidad; por otro, comparte características fisiológicas y homología genética con nematodos parásitos, lo que permite comparaciones válidas [12].

Selección de alternativas químicas de antiparasitarios

En el control parasitario en animales de producción (ej. rumiantes) se describen dos importantes familias químicas entre otras, las Lactonas macrocíclicas y los Imidazotizoles. Dentro de las lactonas macrocíclicas (Ivermectina o Moxidectina, MOX) y los Imidazotiazoles (Levamisol, LEV), el MOX y LEV son dos principios activos que representan a ambas familias de antiparasitarios y que tienen una indicación directa en la terapéutica del control parasitario de animales domésticos, en particular en rumiantes. Si bien, MOX y LEV son nematicidas efectivos, presentan algunas diferencias de relevancia en cuanto a su utilización y a la resistencia que generan en los parásitos.

Moxidectina es conocida por su eficacia prolongada debido a su alta solubilidad en lípidos y a su mayor duración en el organismo animal. Se ha utilizado con éxito para controlar cepas de nematodos resistentes a otros antihelmínticos, como la ivermectina [13]. No obstante, la resistencia también se ha desarrollado contra moxidectina, particularmente en nematodos como *Teladorsagia circumcincta* y en algunas cepas de *Cooperia spp*. en ganado [14]. Esto sugiere que el uso prolongado y exclusivo de moxidectina podría no ser sostenible en el largo plazo [12]. Levamisol, por otro lado, actúa rápidamente y es utilizado típicamente en rotación con otros antihelmínticos para minimizar el desarrollo de resistencia. Aunque se ha observado resistencia a levamisol en diversas regiones, su eficacia se mantiene en algunos contextos incluso cuando otras drogas, como las lactonas macrocíclicas, han fallado [4]. En conclusión, tanto MOX como LEV son herramientas valiosas en el control de infecciones por helmintos, pero deben gestionarse cuidadosamente para conservar su eficacia a largo plazo.
Ambos fármacos (MOX y LEV) difieren de forma marcada en hidrofilicidad/hidrofobicidad (Log P (coeficiente de partición octanol/agua) de 1,2 *vs*. 5,0 para MOX y LEV, respectivamente. Estas diferencias podrían ser de relevancia significativa en sus efectos nematodicidas debido a sus coeficientes de partición. MOX, con mayor lipofilia, permitiría una mejor permeabilidad de membrana y una distribución más amplia en los tejidos lipídicos, resultando en una acción prolongada. En contraste, LEV, con menor lipofilia, tendría una mayor solubilidad en agua, lo que promovería una rápida absorción y eliminación. Las propiedades físico-químicas de ambos compuestos se resumen en la tabla 2.

Estudio de la motilidad con respuesta farmacológica

La acción de fármacos que tengan como base un mecanismo de acción que modifique la actividad nerviosa del nematodo *C. elegans*, permitiría aportar al conocimiento de la acción nematicida de fármacos.

Este estudio busca comparar dos metodologías de evaluación de la motilidad de *C. elegans*: un ensayo de motilidad en medio líquido (solución acuosa) y cuantificación de la detección de haces infrarrojos como proxy de la motilidad, y un ensayo de monitoreo de motilidad en fase sólida (Agar), cuya cuantificación es mediante el análisis de imágenes seriadas. En este estudio las dos metodologías se utilizan para analizar los efectos de la exposición de un rango de concentraciones de MOX y LEV sobre el nematodo *C. elegans.*

2. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento sobre las metodologías de evaluación de fármacos antiparasitarios con acción nematodicida mediante el modelo *Caenorhabdítis elegans.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la respuesta farmacológica de los antiparasitarios MOXIDECTIN y LEVAMISOL en fase líquida utilizando un equipamiento de dispersión de luz infrarroja.
- Caracterizar la respuesta farmacológica de los antiparasitarios MOXIDECTIN y LEVAMISOL en fase sólida utilizando un equipamiento de análisis de imagen de vídeo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo de la técnica de sensibilidad farmacológica

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Gusanos del Institut Pasteur de Montevideo, en colaboración con la Unidad de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay).

Reactivos y disoluciones

Se emplearon principios activos puros de grado técnico de MOX y LEV. Estos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente diluidos en agua hasta obtener

una concentración final de DMSO al 1% en todas las soluciones. Las diluciones se prepararon en serie a partir de una solución madre (SM1) de MOX 2mM y LEV 25mM en DMSO.

Equipamiento

Para la evaluación de la actividad de respuesta farmacológica, se utilizaron dos sistemas de cuantificación de motilidad: WMicrotracker ONE (fase líquida, detección de haces infrarrojo) y WMicrotracker SMART (fase sólida, análisis por video) (PhylumTech, Santa Fe, Argentina).

- **WMicrotracker ONE** – cuantificación de motilidad en fase líquida (PhylumTech, Argentina, https://www.phylumtech.com/home/en/wmicrotracker-one-eng/)

Brevemente, se trata de un equipamiento con un sistema de 384 microhaces infrarrojos, que detectan las pequeñas interferencias generadas cuando el haz de luz es interferido por los organismos presentes en la muestra (figura 1). De esta manera, se registra y procesa un patrón de actividad utilizando un software diseñado específicamente para la adquisición de datos en tiempo real. Un software algorítmico calcula el número de eventos de actividad por unidad de tiempo.

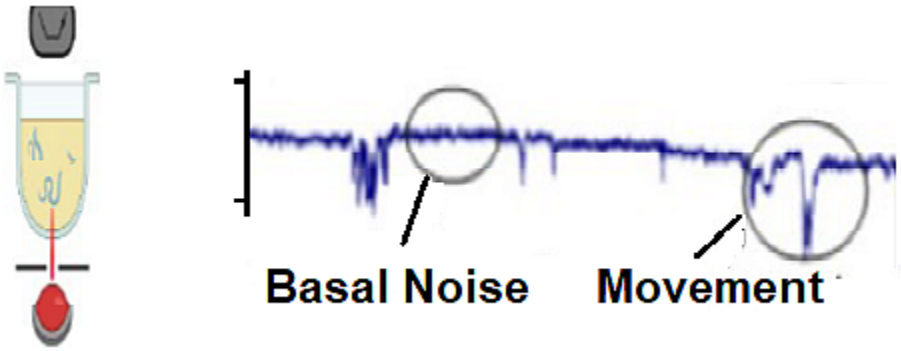


Figura 1. Representación del funcionamiento del equipo Wmicrotracker ONE (tomado de Phylumtech)

- **WMicrotracker SMART** – análisis de motilidad en fase sólida mediante video tracking (PhylumTech, Argentina, https://www.phylumtech.com/home/es/wmicrotracker-smart-esp/)

WMicrotracker Smart (figura 2) obtiene información sobre el comportamiento de las poblaciones de nematodos en función del tiempo y el espacio, así como el seguimiento

de los caminos recorridos y cálculos de velocidad de partículas. En el modelo *C.elegans* utilizando cultivos de medio sólido tipo NGM.

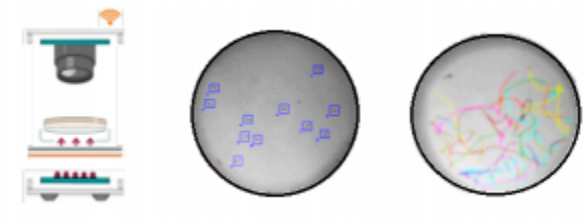


Figura 2. Representación del funcionamiento del equipo Wmicrotracker SMART (tomado de Phylumtech)

Cultivo y mantenimiento de *C. elegans*

Los nematodos fueron mantenidos en placas de agar NGM (Nematode Growth Media), sembradas con la cepa *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento. Las placas de cultivo se mantuvieron a 20 °C en incubadora, bajo condiciones estándar de laboratorio. Los animales fueron sincronizados en estadío L1 utilizando la solución de bleaching (agua:Agua Jane:NaOH 5M en relación 5:3:2). La cepa OP50 fue cultivada en medio LB a 37 °C con agitación a 200 RPM y luego sembrada en placas de NGM agar (1 mL por placa). Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 48 horas antes de su uso. Los procedimientos indicados siguieron las recomendaciones descritas por Risi et al [15].

Ensayos

3.1.1. Dilución de LEV y MOX

Se obtuvieron las soluciones madre 1 (SM1) de MOX 2mM y LEV 25mM diluidas en DMSO. A partir de las mismas se realizaron 5 diluciones en M9 1 % DMSO obteniendo 5 soluciones de trabajo (ST) en el rango de 0.1 a 1.6 µM para MOX y de 1.562 a 25 µM para LEV. Juntamente con los grupos MOX y LEV, se anexo un Control (DMSO 1.0%).

3.1.2. Fase líquida – EQUIPO WMICROTRACKER ONE

Preparación de placa

Se utilizaron placas estériles de 96 pocillos. A cada pocillo se le añadió 40 µL de la solución de droga correspondiente y 60 µL de suspensión acuosa de gusanos, logrando una densidad estimada de ~60 individuos/pocillo.

Registro de motilidad

El análisis de motilidad se realizó mediante el sistema WMicrotracker ONE, que cuantifica el movimiento de los nematodos por detección de interrupciones de haces infrarrojos. Las mediciones se realizaron por triplicado a 27°C a distintos tiempos a tras la exposición a las drogas.

3.1.3. Fase sólida – EQUIPO WMICROTRACKER SMART

Preparación de placas

Un día antes del experimento, se prepararon placas vacías a las cuales se les agregó agar fundido mezclado con las respectivas concentraciones de droga (MOX o LEV, disueltas en DMSO al 1%). Se vertió la mezcla en condiciones estériles y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h. Se incluyó una placa de control con solo DMSO al 1%.

Preparación de gusanos

El día del experimento, se recolectaron gusanos adultos de las placas de cultivo, utilizando 1 mL de medio M9 para su desprendimiento. Se realizaron lavados por decantación en tubos Eppendorf, y se ajustó la concentración de gusanos a una densidad aproximada de 20 individuos en 10 µL, mediante conteo en portaobjetos con ayuda de microscopio.

Siembra en placas

La siembra se realizó en condiciones estériles utilizando placas compatibles con el equipo SMART. Se colocó un aro de cobre para delimitar la zona de siembra y se aplicaron 3 gotas de 6 µL de suspensión por placa (aproximadamente 36 gusanos totales). Se dejó secar durante 5 minutos y se contó el número de gusanos sembrados mediante observación microscópica.

Registro y análisis de motilidad

Cada placa fue analizada en el sistema WMicrotracker SMART. Antes de iniciar la medición, se aplicaron tres golpes suaves a la placa para activar el movimiento de los gusanos. Luego, se introdujo la placa en el equipo y se realizó una corrida de 5

minutos, repitiendo el protocolo para una segunda (T2), tercera (T3) y cuarta (T4) corrida posterior con diferencia de 30 minutos entre lecturas.

El software registró los siguientes parámetros:

- *Motility Score:* la fracción de eventos de detección correspondientes a partículas en movimiento (distancia > 1 mm). El rango está entre 0 y 1.
- *Average Speed (mm/s):* la velocidad media de todas las partículas detectadas
- *Trajectory Turning rate (mm/part):* la distancia media de todas las partículas detectadas

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el entorno estadístico R (Versión 4.5.0 – 2025-04-11 ucrt). Las curvas de dosis-respuesta fueron ajustadas mediante modelos sigmoideos de cuatro parámetros (log-logísticos; Emax – Slope – Baseline – ED_{50}), utilizando librerías especializadas del entorno R, como las *library drc, lmer* y *tidyverse*. Se realizaron análisis comparativos entre grupos, asegurando replicación técnica y biológica.

4. RESULTADOS

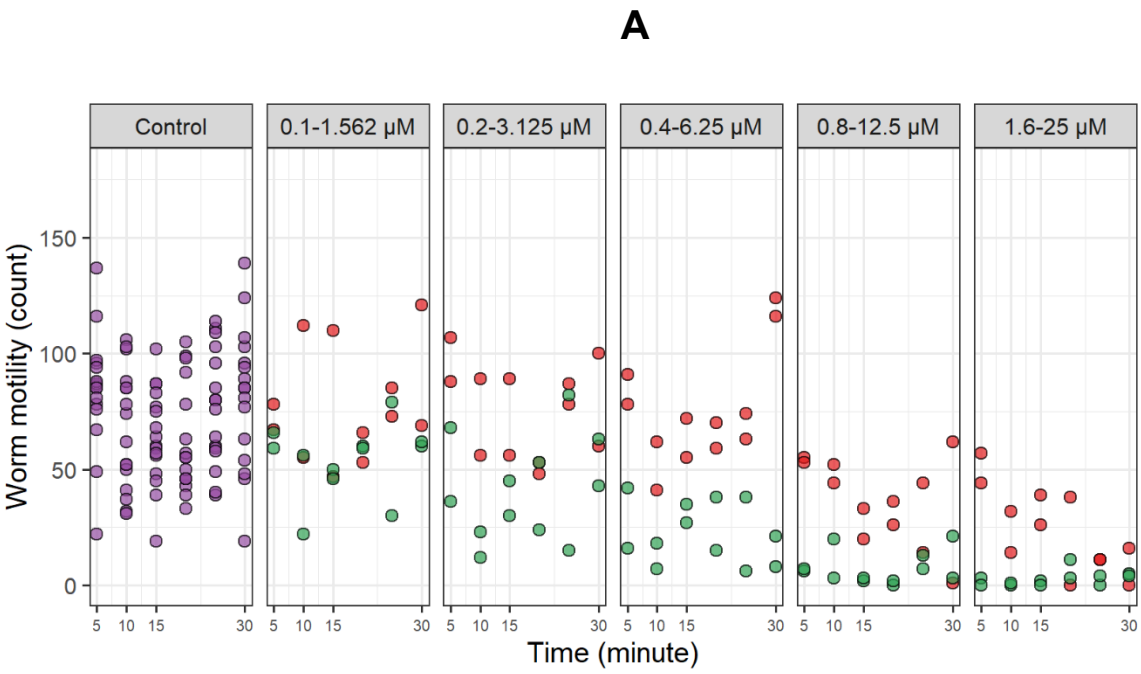
Los resultados que surgen de ambos estudios describen los efectos farmacológicos, así como la comparación de la eficacia de MOX y LEV con diferencias en su hidrofilicidad/hidrofobicidad mediante ambas metodologías.

Fase líquida

La exploración del efecto farmacológico (inhibición de la motilidad) a la exposición a los grupos Control, MOX y LEV (µM) en fase líquida se muestran en la figura 3. En las figuras 3A (30 minutos) y 3B (90 minutos) se visualiza un efecto inhibidor sobre la motilidad del *C. elegans* dependiente del tiempo de exposición (minutos) a cada concentración (µM), presentando un efecto máximo en las mayores concentraciones de exposición. El grupo control sin exposición a ningún fármaco, presenta una actividad en todo el período de evaluación.

De la inspección visual en las distintas concentraciones de exposición, se perciben diferencias entre los efectos inhibidores de MOX y LEV. MOX induce un efecto inhibidor dependiente del tiempo de exposición y la concentración (más concentración mayor efecto inhibidor), con un efecto cercano al 100% de inhibición de la motilidad a partir de los 30 minutos de exposición a concentraciones de 1,6 µM/mL en los primeros 30 minutos de exposición (Figura 3A). El efecto de la MOX es irreversible, dado que los

gusanos no se recuperan de la pérdida de motilidad a ninguna de las concentraciones (Figura 3B). Por otro lado, LEV no se vería mayormente afectado por el tiempo de exposición y si por la concentración al que son expuestos los nematodos, siendo 100% eficaz en la inhibición con concentraciones de 25 µM/mL en los primeros 30 minutos (Figura 3A), pero con una afectación transitoria dependiente del tiempo (Figura 3B), es decir disminuye inicialmente su motilidad y luego algún gusano en particular presenta actividad, ver por ejemplo la curva en las concentraciones 6.25 a 25 µM.



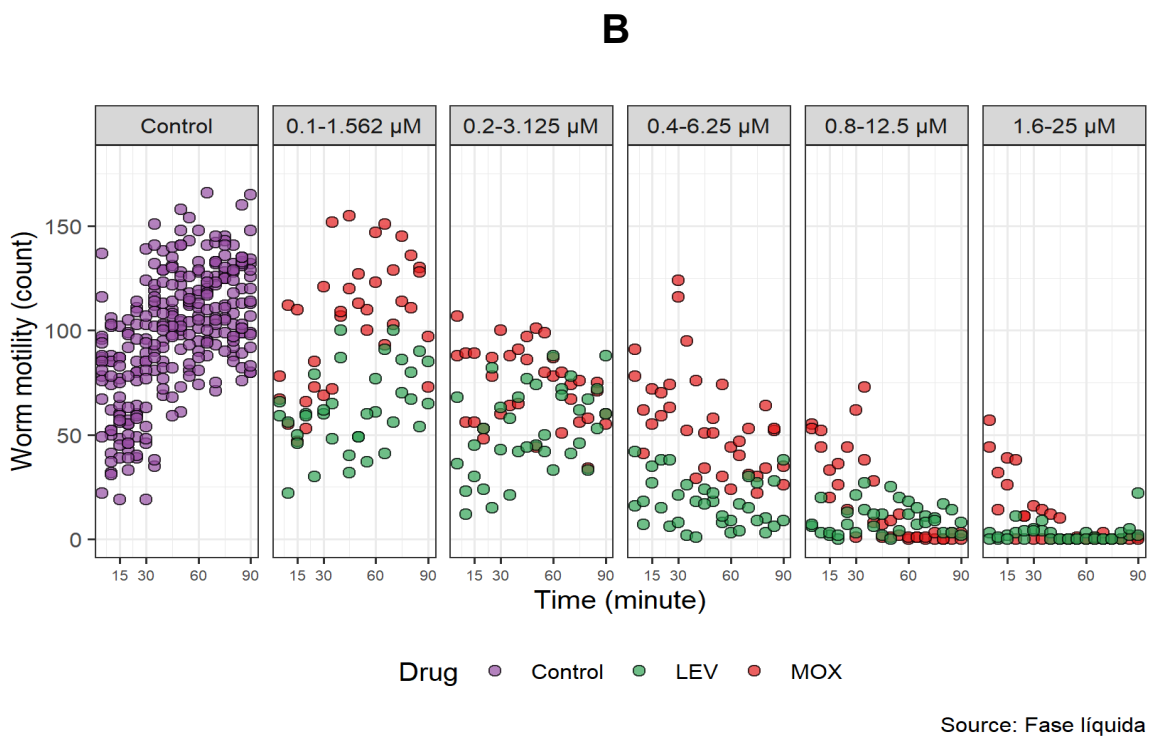


Figura 3: *Worm Motility* de *C. elegans* luego de la exposición durante 30 (A) y 120 (B) minutos a concentraciones crecientes de Moxidectina (MOX), Levamisol (LEV) o sin fármaco (control). Los valores de concentración se expresan en µM, siendo el primer valor el correspondiente a la concentración de MOX y el segundo a la de LEV.

Fase sólida

El análisis comparativo de la acción de LEV y MOX sobre la motilidad de *C. elegans* en fase sólida reveló diferencias significativas en la cinética del efecto farmacológico al igual que en fase líquida.

Para el caso del LEV se visualiza que a medida que se incrementa las concentraciones de exposición se presenta un mayor efecto el porcentaje de inhibición en el *Motility Score* (ED_{50} 51 ± 26^{a}; 30 ± 15^{b}; 21 ± 11^{c} para los tiempos T1 (5 min); T2 (10 min) y T3 (15 min), respectivamente – $p<0.05$) (Figura 4) viéndose acentuada la inhibición a medida que el tiempo de exposición es mayor (T3>T2>T1). Por otro lado, la variable *Average speed* (mm/s) muestra un comportamiento similar respecto a la concentración (disminuye a medida que esta aumenta), pero se mantiene prácticamente constante entre los distintos tiempos de exposición (T1 = T2 = T3) (Figura 5). No se visualiza un efecto directo marcado en la *Trajectory Turning rate* a las diferentes concentraciones o tiempos de exposición (Figura 6).

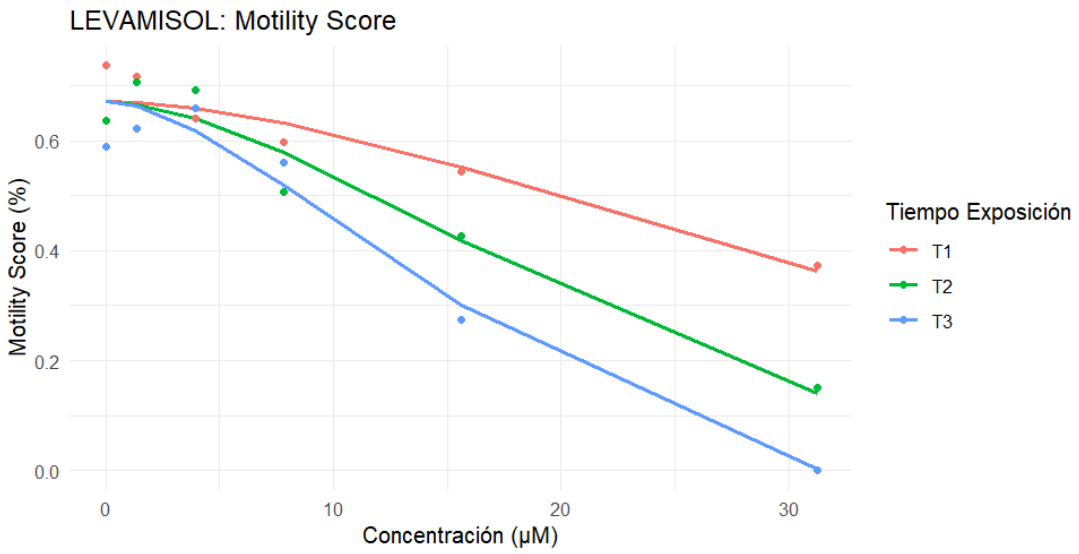


Figura 4: *Motility Score* de *C. elegans* luego de la exposición a concentraciones crecientes de Levamisol (LEV) a cuatro tiempos de exposición T1 (5 min); T2 (10 min) y T3 (15 min).

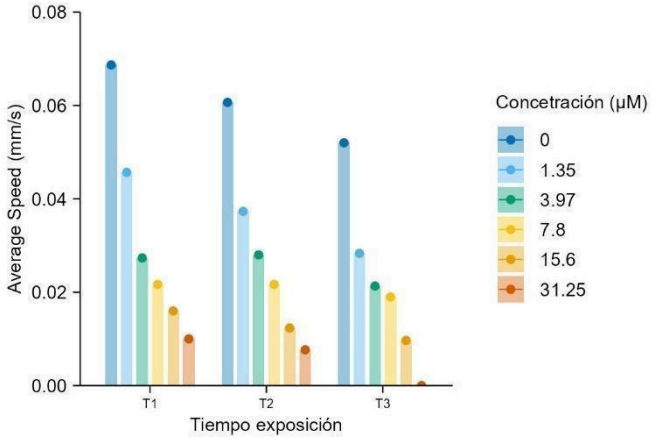


Figura 5: *Average Speed (mm/s)* de *C. elegans* luego de la exposición a concentraciones crecientes de Levamisol (LEV) a cuatro tiempos de exposición (T1 (5 min); T2 (10 min) y T3 (15 min).

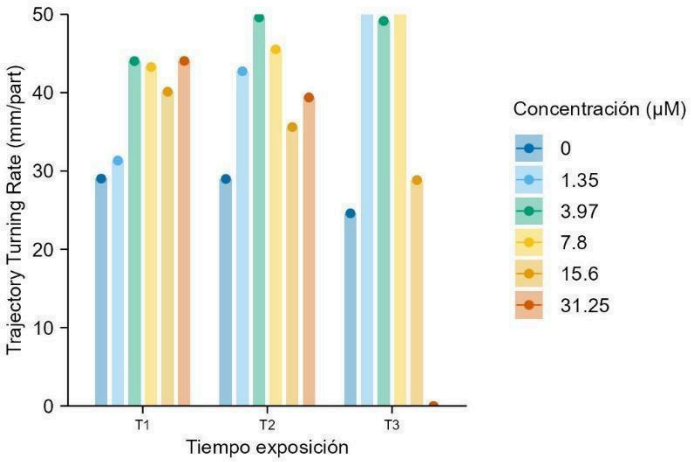


Figura 6 *Trajectory Turning rate (mm/part)* de *C. elegans* luego de la exposición a concentraciones crecientes de Levamisol (LEV) a cuatro tempos de exposición (T1 (5 min); T2 (10 min) y T3 (15 min)).

A diferencia del LEV, MOX el *Motility Score* presenta un tiempo más prolongado para iniciar a manifestar los efectos inhibitorios en la motilidad (ver figura 7 – tiempo exposición T1), y potenciando su acción (ED_{50}) a medida que se incrementa las concentraciones y el tiempo de exposición (ED_{50} 1,8±0,29^{a}; 0,25±0,01^{b}; 0,13±0,001^{c}; 0,07±0,004^{d} para los tiempos T1 (5min); T2 (10 min), T3 (15 min) y T4 (20 min), respectivamente – $p<0.05$) (Figura 7). Por otro lado, el *Average speed* (mm/s) manifiesta similar comportamiento ($p>0.05$), dependiente del tiempo de exposición (Figura 8) y efecto notorio en la *Trajectory Turning rate* a partir de que las concentraciones de exposición son superiores a 0.5 a T2 y de 0.25 a T3 y T4 (Figura 9).

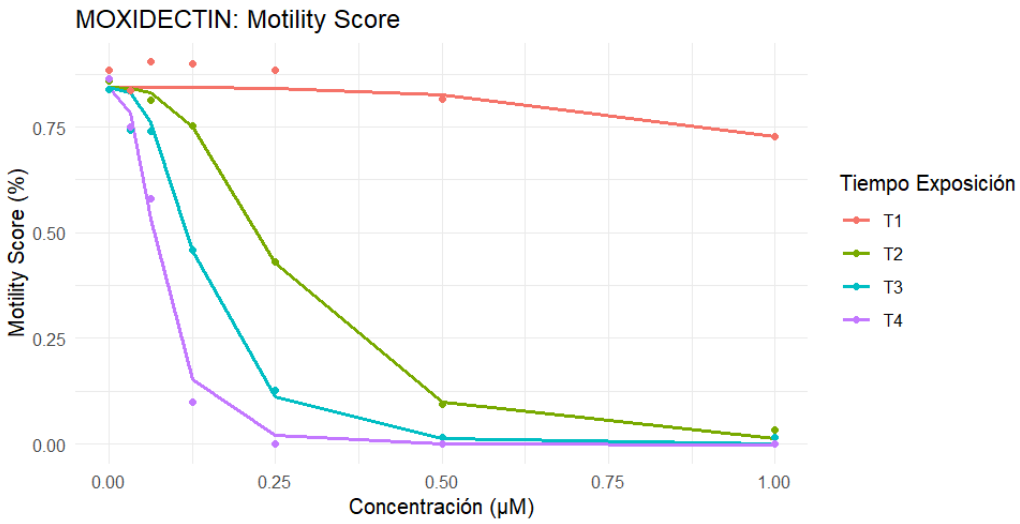


Figura 7: *Motility Score* de *C. elegans* luego de la exposición a concentraciones crecientes de Moxidectina (MOX) a cuatro tiempos de exposición (T1 (5min); T2 (10 min), T3 (15 min) y T4 (20 min)).

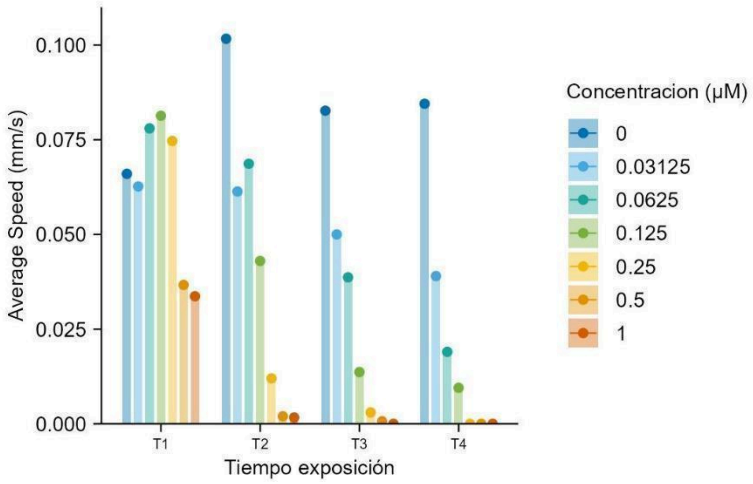


Figura 8: *Average Speed (mm/s)* de *C. elegans* luego de la exposición a concentraciones crecientes de Moxidectina (MOX) a cuatro tiempos de exposición (T1 (5min); T2 (10 min), T3 (15 min) y T4 (20 min)).

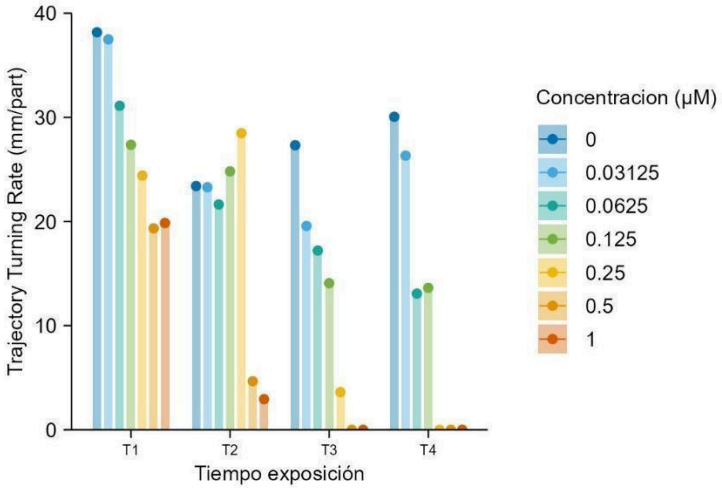


Figura 9: *Trajectory Turning rate (mm/part)* de *C. elegans* luego de la exposición a concentraciones crecientes de Moxidectina (MOX) a cuatro tempos de exposición (T1, T2, T3 y T4).

5. DISCUSIÓN

La comparación entre las metodologías en fase líquida y sólida para evaluar la sensibilidad de *C. elegans* a la acción de LEV y MOX confirma que ambos fármacos son eficaces en la reducción de la motilidad. No obstante, también se evidencia que el tipo de análisis (fase líquida o fase sólida) influye de manera significativa en la caracterización del efecto farmacológico. En particular, el sistema en fase líquida permite una aproximación al efecto farmacológico sobre el comportamiento de un grupo considerable de gusanos, con una alta capacidad para generar repeticiones, lo que fortalece la visualización del efecto inhibidor de la actividad a lo largo del tiempo, sin distinguir las características del efecto inhibitorio. Por otro lado, el sistema en fase sólida proporciona información complementaria valiosa y de mayor sensibilidad sobre las alteraciones cualitativas y cuantitativas del movimiento, representando una ventaja clara frente al sistema líquido para describir exclusivamente el efecto inhibitorio de los fármacos.

El LEV, un antihelmíntico perteneciente al grupo de los imidazotiazoles, demostró en el ensayo de fase líquida un efecto inhibidor rápido. La fase sólida complementa este tipo de efecto, permitiendo observar cómo la inhibición inicial se intensifica en los primeros 15 minutos de exposición. Este patrón podría explicarse por su mecanismo de acción

como agonista nicotínico (nAChR), que provoca una despolarización sostenida y conduce a una parálisis espástica. En este contexto, el *Score Motility* (un índice compuesto que integra el desplazamiento, la continuidad del movimiento y la actividad locomotora global del nematodo) mostró una inhibición progresiva a medida que aumentaron tanto la concentración como el tiempo de exposición. Es decir, aunque inicialmente puede observarse un movimiento descoordinado, el *Score Motility* evidencia una pérdida creciente de la capacidad locomotora general. De manera complementaria, con una *Average Speed* que disminuye con la concentración y un *Trajectory Turning Rate* relativamente estable, se sugiere que, a pesar de que pudiera presentarse un aumento transitorio en la actividad del gusano, el desplazamiento efectivo se ve cada vez más comprometido.

La rápida acción y el comportamiento aislado de recuperación parcial de algún gusano en la fase líquida del LEV son coherentes con su solubilidad moderada en agua (~2 g/L; 20 mM) y su bajo logP (1.2), características que favorecen una rápida difusión en el medio acuoso del entorno del nematodo. Su masa molar relativamente baja (204.29 g/mol) también facilita esta difusión, generando una acción temprana y transitoria. Por otro lado, es importante recordar que, dado que el LEV presenta un pKa de 7.0–7.8, se sugiere que en un medio como el de la fase sólida (pH ~7.0), el LEV se encuentra parcialmente ionizado, lo que mejoraría su solubilidad sin comprometer su capacidad de atravesar membranas celulares. Las propiedades mencionadas (ver anexo 1 y 2) podrían contribuir a explicar parcialmente el perfil farmacodinámico observado, caracterizado por un inicio rápido de acción, seguido de una fase de parálisis progresiva en un periodo de tiempo relativamente corto.

En contraste, MOX, una lactona macrocíclica, tanto en fase líquida como sólida, mostró un inicio de acción retardado, sin efectos inmediatos visibles sobre la motilidad durante las fases iniciales del experimento en fase sólida (reflejado en el *Motility Score*), con un leve efecto inhibidor únicamente a altas concentraciones en fase líquida. Este comportamiento podría explicarse por su baja solubilidad en agua y su alta lipofilicidad (logP 5.0–6.0), que limitan su biodisponibilidad inmediata pero favorecen su acumulación en tejidos lipídicos del parásito (ver anexo 1 y 2). Además, su elevada lipofilicidad no solo promueve su retención en compartimentos ricos en lípidos, sino que también la hace menos susceptible al eflujo mediado por bombas P-gp [14], las cuales suelen excretar con mayor eficiencia compuestos más hidrosolubles. En conjunto, estos factores podrían contribuir a un menor eflujo de MOX y a un efecto más prolongado en el gusano, a pesar del inicio de acción más lento.

Por otro lado, el mecanismo de acción se fundamenta en la activación sostenida de los canales de cloruro mediados por glutamato (GluCl), lo que induce una hiperpolarización de la membrana neuronal y un bloqueo progresivo de la transmisión nerviosa,

resultando en parálisis flácida. La mayor masa molar (500.66 g/mol) y su estructura lipofílica sugieren una distribución más lenta en el medio acuoso, pero también una retención prolongada en el organismo del helminto, lo que explica el efecto sostenido observado en fases posteriores del experimento (T2–T4), con una reducción progresiva de la motilidad hasta su abolición completa. El pKa ácido (~6.0) indica que la MOX se encuentra mayormente no ionizada en fase sólida, lo que favorecería su difusión pasiva a través de membranas, aunque sin compensar su baja solubilidad acuosa inicial, razón por la cual su efecto requiere más tiempo para manifestarse. Con el incremento del tiempo de exposición, se observa que el efecto inhibitorio a nivel de la *Average Speed* y *Trajectory Turning Rate* se acentúa.

En resumen, se puede observar que la acción de MOX y LEV sobre la motilidad de los gusanos es claramente distinta. En particular, MOX presenta un efecto retardado sobre el nematodo, mientras que LEV actúa de manera más rápida. Es importante mencionar que las concentraciones de exposición y los tiempos de las mediciones no son exactamente iguales ya que requirieron la adaptación al modelo, siendo la fase líquida una medición hasta 120 minutos, con lecturas cada 5 minutos (24 lecturas), a diferencia de la fase sólida, en la que se midieron tan solo 3 o 4 lecturas, cada 5 minutos, dentro de los primeros 20 minutos. Si bien podría considerarse que las diferencias en la intensidad o el número de repeticiones entre ambas metodologías son relevantes, la información que aportan ambas aproximaciones permite valorar la complementariedad de las metodologías en la determinación de los efectos farmacológicos en el modelo *C. elegans*. En el ensayo en fase líquida, los resultados permiten comparar cómo cada droga actúa en función del tiempo de exposición y la concentración, mostrando dinámicas de inhibición. Mientras que el ensayo en fase sólida permite, a través de sus indicadores (*Motility Score, Average Speed y Trajectory Turning Rate*), describir la trayectoria y el desplazamiento global del nematodo, integrando variables como la distancia recorrida, la continuidad del movimiento y la capacidad del organismo de mantener un patrón locomotor normal.

6. CONCLUSIÓN

Las diferencias observadas en los patrones de motilidad y la cinética de respuesta en *C. elegans* podrían estar asociadas a las propiedades fisicoquímicas de los compuestos analizados. El levamisol, debido a su solubilidad acuosa y baja masa molecular, actúa rápidamente generando un pico de actividad motora y parálisis espástica. En contraste, la moxidectina, por su alta lipofilia y mayor masa molecular, requiere más tiempo para penetrar y acumularse en los tejidos del parásito, pero ejerce un efecto más sostenido y letal.

La aproximación mediante dos metodologías de evaluación de fármacos antiparasitarios con acción nematodicida permitió comprender cómo las características estructurales y fisicoquímicas de los antihelmínticos modulan la respuesta farmacológica en la inhibición de la motilidad del C. elegans, así como entender la eficacia y el comportamiento farmacodinámico, aportando herramientas útiles para futuras estrategias terapéuticas, especialmente en contextos de evaluación de compuestos nematodicidas o escenarios de resistencia parasitaria.

Referencias Bibliográficas

[1]. Molento, M. B.; Fortes, F. S.; Pondelek, D. A. S.; Borges, F. D. A.; Chagas, A. C. D. S.; Torres-Acosta, J. F. D. J.; Geldhof, P. *Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America.* Veterinary Parasitology **2011**, *180*(1–2), 126–132. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.033.

[2]. Sangster NC, Cowling A, Woodgate RG. Ten events that defined anthelmintic resistance research. Trends Parasitol. 2018;34:553-563. doi:10.1016/j.pt.2018.05.001.

[4] Chandrawathani, P., Höglund, J., Waller, P. J., & Adnan, M. (2003). Evolution of high-level, multiple anthelmintic resistance on a sheep farm in Malaysia. *Tropical Animal Health and Production*, *35*(1), 17–25. https://doi.org/10.1023/a:1022023620599

[3]. Geerts, S., & Gryseels, B. (2001). Anthelmintic resistance in human helminths: a review. *Tropical Medicine & International Health*, *6*(11), 915–921. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00774.x

[5]. Jackson, F., & Coop, R. L. (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, *Suppl 120*(7), 95–107. https://doi.org/10.1017/s0031182099005740

[6]. Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites & Vectors*, *6*(1). https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-153

[7]. Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaules, Y., Hotz, R., Goebel, T., Hosking, B. C., Pautrat, F., Wieland-Berghausen, S., & Ducray, P. (2008). Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research*, *103*(4), 931–939. https://doi.org/10.1007/s00436-008-1080-7

[8] Risi G, Aguilera E, Ladós E, Suárez G, Carrera I, Álvarez G, Salinas G. Caenorhabditis elegans infrared-based motility assay identified new hits for nematicide drug development. Vet Sci. 2019;6(1):29. doi:10.3390/vetsci6010029.

[9]. Salinas, G., & Risi, G. (2018). *Caenorhabditis elegans: nature and nurture gift to nematode parasitologists.* Parasitology, 145(8), 979-987.

[10]. Hahnel, S. R., Dilks, C. M., Heisler, I., Andersen, E. C., & Kulke, D. (2020). *Caenorhabditis elegans in anthelmintic research – Old model, new perspectives.* International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 14, 237-248.

[11]. Holden-Dye L.; Walker R. J. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in Caenorhabditis elegans. WormBook: The Online Review of C. elegans Biology 2014, 1–29. DOI: 10.1895/wormbook.1.143.2.

[12]. Mayoral Peña Z.; Piña Vázquez D. M.; Gómez Sánchez M.; Salazar Olivo L. A.; Aguilar Tipacamú G.; Arellano Carbajal F. El nematodo Caenorhabditis elegans como modelo para evaluar el potencial antihelmíntico de extractos de plantas. Rev. Mex. Cienc. Pecuarias. 2017;8(3):279-289. https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i3.4504

[13]. Sargison, N. D., Bartley, D. J., Jackson, F., & Moir, A. C. P. (2005). Failure of moxidectin to control benzimidazole–, levamisole– and ivermectinresistant Teladorsagia circumcincta in a sheep flock. *Veterinary Record*, *156*(4), 105–109. https://doi.org/10.1136/vr.156.4.105

[14]. Kieran P. J. (1994). Moxidectin against ivermectin-resistant nematodes--a global view. Australian veterinary journal, 71(1), 18–20. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb00895.x

[15] Risi, G., Aguilera, E., Ladós, E., Suárez, G., Carrera, I., Álvarez, G., & Salinas, G. (2019). Caenorhabditis elegans infrared-based motility assay identified new hits for nematicide drug development. *Veterinary Sciences, 6*(1), 29. https://doi.org/10.3390/vetsci6010029

ANEXOS

Tabla 1: Principales parámetros reportados en relación a las propiedades nematodicidas de Levamisol y Moxidectina.

Parámetro	Levamisol	Moxidectina
Tiempo de inicio de acción	Rápido (hiperactividad inicial)	Lento (efecto acumulativo)
Tipo de parálisis	Espástica (nAChR activación sostenida)	Flácida (hiperpolarización neuronal)
Duración del efecto	Transitorio	Prolongado
Solubilidad	Moderada en agua	Muy baja en agua
Lipofilicidad	Baja	Alta
Mecanismo principal	Receptores colinérgicos	Canales de cloro (GluCl)

Tabla 2: Propiedades Físico-Químicas de Moxidectina y Levamisol

Propiedad	Moxidectina	Levamisol
Fórmula molecular	C37H53NO8	C11H12N2S
Masa molecular	500.66 g/mol	204.29 g/mol
Solubilidad en agua	Muy baja (insoluble)	Moderada (~2 g/L)
LogP (coeficiente de partición octanol/agua)	5.0-6.0	1.2
Punto de fusión	~140–150 °C (degradación)	60–62 °C
pKa	~6.0 (ácido débil)	7.0-7.8
Estado físico a temperatura ambiente	Sólido cristalino	Sólido cristalino blanco o blanquecino
Estabilidad	Estable frente a la hidrólisis; fotosensible	Estable en condiciones normales de almacenamiento
Clase BCS (si aplica)	Clase II: baja solubilidad, alta permeabilidad	Clase I: alta solubilidad, alta permeabilidad
Biodisponibilidad oral (en animales)	Alta, con prolongada vida media (hasta 20 días en bovinos)	Alta, vida media corta (~4–6 horas)
Metabolismo	Hepático (CYP3A)	Hepático (oxidación y desulfuración)
	