

ENSAYO DE COMPUESTOS ANTIPARASITARIOS QUE ACTÚAN A NIVEL DE LA TUBULINA EN CULTIVOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Assay of Antiparasitic Compounds Targeting Tubulin in Schistosoma Mansoni Cultures

Hiba CHABANT¹ 

María Alejandra VILLAMIZAR MONSALVE¹ 

Javier SÁNCHEZ MONTEJO¹ 

Miguel MARÍN FOLGADO² 

Rafael PELÁEZ LAMAMIE DE CLAIRAC ARROYO² 

Julio LÓPEZ ABAN¹ 

María Belén VICENTE SANTIAGO^{1*} 

¹ Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Grupo e-INTRO (Enfermedades Infecciosas y Tropicales). IBSAL-CIETUS. Área de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, España

² Laboratorio de Química Orgánica y Farmacéutica, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain

* Correo-e: belvi25@usal.es

RESUMEN: La esquistosomosis es una enfermedad tropical desatendida que afecta a más de 250 millones de personas y está causada por trematodos del género *Schistosoma spp.* El praziquantel es el tratamiento de elección, aunque presenta limitaciones frente a las formas juveniles y se han descrito casos de resistencia, lo que evidencia la necesidad de nuevos fármacos eficaces en todas las etapas del parásito. En este estudio se evaluaron in vitro 26 compuestos con potencial actividad frente a *Schistosoma mansoni*. El ciclo biológico del parásito se mantuvo en condiciones de laboratorio, utilizando ratones como hospedadores definitivos y caracoles como hospedadores

intermedios. La viabilidad de las formas juveniles (esquistosómulas) y adultas se analizó mediante técnicas de microscopía e inteligencia artificial. Los compuestos, diseñados por el Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, tienen como diana la tubulina, inhibiendo su polimerización, y no mostraron citotoxicidad significativa en líneas celulares humanas. Entre los resultados, el compuesto 1 indujo una letalidad del 100 % en ambos estadios del parásito, con valores prometedores de concentración letal 50. En conclusión, este compuesto mostró un elevado potencial *in vitro* frente a *S. mansoni*, aunque serán necesarios estudios *in vivo* para confirmar su eficacia y seguridad.

Palabras clave: esquistosomosis; resistencia a fármacos; tubulina; ensayos *in vitro*.

ABSTRACT: Schistosomiasis is a neglected tropical disease that affects over 250 million people worldwide. It is caused by trematodes of the genus *Schistosoma spp.* The conventional treatment, praziquantel, is effective against the adult stages of the parasite but shows limited efficacy on juvenile forms, and cases of drug resistance have been reported. This underscores the need to develop new antiparasitic compounds active against all life cycle stages of the parasite. In this study, 26 compounds were evaluated *in vitro* against *Schistosoma mansoni*. The parasite's life cycle was maintained in the laboratory using mice as definitive hosts and snails as intermediate hosts. The compounds, designed by the Department of Pharmaceutical Chemistry at the Faculty of Pharmacy, target tubulin by inhibiting its polymerization. Their viability effects on juvenile (schistosomula) and adult worms were assessed using microscopy and artificial intelligence. All compounds had been previously tested on human cell lines, showing no significant cytotoxicity. Among the results, compound 1 exhibited 100% lethality in both parasite stages, with promising lethal concentration values. In conclusion, compound 1 demonstrated strong *in vitro* efficacy against *S. mansoni*, representing a potential candidate for further studies. However, additional *in vivo* experiments are required to confirm its safety and therapeutic potential.

Keywords: schistosomiasis; drug resistance; tubulin; *in vitro* assays.

1. INTRODUCCIÓN

La esquistosomosis es una enfermedad tropical desatendida que afecta a más de 250 millones de personas en todo el mundo, distribuyéndose en regiones de África, Medio Oriente, Caribe, Brasil, Venezuela y Surinam. La infección se adquiere al llevar a cabo actividades agrícolas, domésticas, o profesionales, que implican contacto con aguas contaminadas. Es causada por trematodos digenéticos, del género *Schistosoma* spp. Las principales especies que afectan al hombre son *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. guineensis* y *S. intercalatum*. Esta enfermedad puede cursar de forma asintomática o con manifestaciones como fiebre, dolor abdominal, diarrea, hepatomegalia y esplenomegalia. A largo plazo, puede provocar fibrosis hepática, hipertensión portal y daño renal (Colley y Secor, 2014).

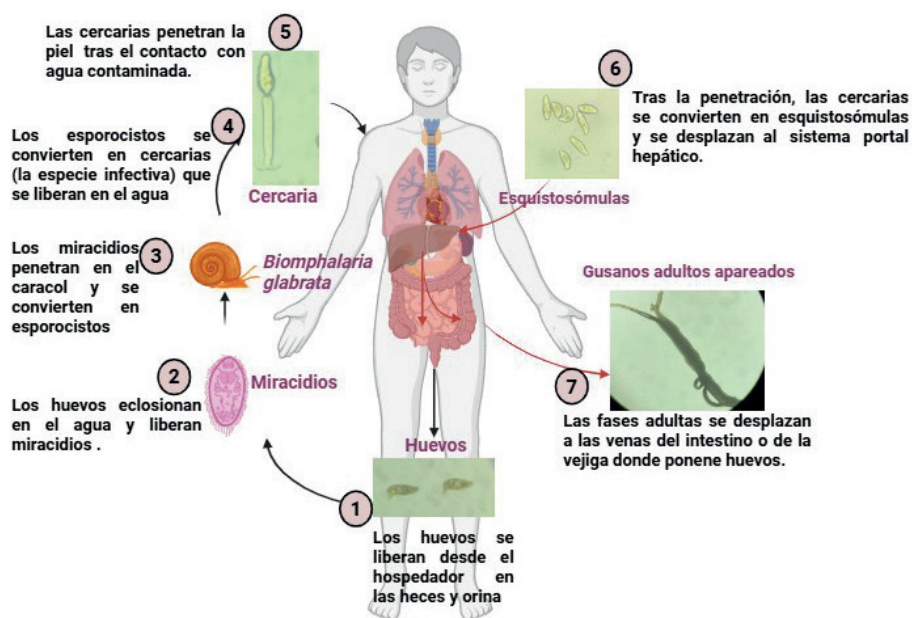


Figura 1. Ciclo biológico de *S. mansoni*, con imágenes tomadas en el Departamento de Biología Animal, Ecología, Parasitología, Edafología y Química Agrícola, Universidad de Salamanca. Imagen realizada con BioRender.

El tratamiento de elección, desde hace 40 años, es el praziquantel (PZQ), administrado a una dosis de 40 mg/kg (Coeli *et al.*, 2013), que actúa provocando parálisis por contracción tetánica de la musculatura del parásito al aumentar la permeabilidad de las membranas celulares al calcio y daño en los tejidos parasitarios causando vacuolización rápida del tegumento. Es eficaz contra los estadios adultos del parásito pero no actúa sobre las formas juveniles. En los últimos años han aparecido resistencias, lo que hace necesario desarrollar nuevos compuestos antiparasitarios con mayor eficacia frente a todos los estadios (Vale *et al.*, 2017). Se han explorado compuestos análogos al PZQ (Villamizar-Monsalve *et al.*, 2024), así como tratamientos antitumorales y antimaláricos en busca de alternativas más eficaces para tratar la esquistosomosis. El mecanismo de resistencia al PZQ estaría asociado con transportadores de proteínas ABC (casete de unión a ATP), como la glicoproteína-P (Pgp) y las proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos (MRP). En *S. mansoni*, se han identificado homólogos de estos transportadores, como SmMRP1 y SMDR2 (Vale *et al.*, 2017). Por otra parte, el PZQ, un medicamento de clase 2 con baja biodisponibilidad, se comercializa como una mezcla racémica siendo activo únicamente un isómero (R)-PZQ (Sun *et al.*, 2016). Esto requiere una dosis doble para alcanzar la eficacia deseada. El objetivo de este trabajo es evaluar nuevos compuestos antiparasitarios efectivos en todos los estadios de *S. mansoni*, con el fin de identificar alternativas al praziquantel.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Mantenimiento del ciclo y cultivo de *S. mansoni*

2.1.1. Animales de experimentación

El ciclo de vida de *S. mansoni* se mantiene en el laboratorio siguiendo el protocolo de (Vicente *et al.*, 2016). Se utilizan ratones CD1 de 6-8 semanas como hospedadores definitivos y caracoles de la especie *Biomphalaria glabrata* como hospedadores intermedios. Los caracoles se infectaron con 7-10 miracidios, y después de 28 días se expusieron a luz y a una temperatura de 26 °C durante 3 horas para inducir la emisión de las cercarias. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron realizados de acuerdo con las normas internacionales de bienestar animal y contaron con la aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal.

2.1.2. Transformación de cercarias a esquistosómulas

Una vez obtenida la suspensión de cercarias se eliminaron los residuos gruesos con una pipeta y se inmovilizaron en hielo durante 30 minutos y se realizó el conteo total. Para la transformación de cercarias a esquistosómulas se siguieron

los protocolos de (Milligan y Jolly, 2011). Este procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar bajo un protocolo de seguridad que incluyó el uso de equipo de protección personal, desinfección de superficies y materiales y eliminación de residuos biológicos. La suspensión de cercarias previamente obtenida se centrifugó durante 3 minutos a 100 g en un tubo Falcon de 50 mL, y se retiró el sobrenadante. Se completó hasta un volumen de 10 mL con una solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) suplementada con penicilina/estreptomicina a una concentración final de 100 unidades/100 µg/mL, a 4 °C. Este volumen se transfirió a una jeringa de 10 mL conectada a otra jeringa del mismo volumen mediante una llave de tres vías con un sistema de Luer-lock. La solución se pasó entre las jeringas de 10 a 15 veces para realizar la transformación mecánica. La suspensión resultante de esquistosómulas se vertió en una placa Petri con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con penicilina/estreptomicina a 37 °C separando el cuerpo de las colas agitando levemente la placa (Marxer *et al.*, 2012). Se distribuyeron 20 esquistosómulas en 50 µL por cada pocillo en una placa de 96 pocillos. Los pocillos se completaron con 175 µL de DMEM suplementado y se incubó a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante 12 a 24 horas.

2.2. Cribado de diferentes compuestos antiparasitarios en esquistosómulas mediante inteligencia artificial

Los compuestos antiparasitarios fueron suministrados por el Laboratorio de Química Orgánica y Farmacéutica, del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca. Inicialmente diseñados y sintetizados como quimioterapéuticos, estos compuestos están basados en su actividad anti-tubulina dirigidos al sitio de unión de la colchicina.

Se cribaron 26 compuestos disueltos en DMSO a una concentración final de 10 µM en placas de 96 pocillos de fondo curvo. La auranofina a 10 µM se usó como control positivo para esquistosómulas (Lombardo *et al.*, 2019) y el PZQ a 10 µM para adultos. El DMSO a una concentración de 1 % v/v y el medio DMEM se utilizaron como controles negativos. Las muestras se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂. La viabilidad se evaluó mediante un sistema semiautomatizado que emplea inteligencia artificial a las 0, 24, 48, y 72 horas para clasificar las esquistosómulas en dos categorías: sanas (móviles, sin cambios en morfología o transparencia, con un puntaje de 3) y afectadas (puntaje de 0-2), con daño en el tegumento, transparencia reducida, granularidad disminuida, alta opacidad y/o muerte. Para los resultados finales, se consideró la viabilidad a las 72 horas como:

$$\text{porcentaje de viabilidad} = (\text{número de esquistosómulas sanas} / \text{total de esquistosómulas}) \times 100$$

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se determinó la concentración letal 50 (CL₅₀) en aquellos compuestos activos (Villamizar-Monsalve *et al.*, 2024).

2.3. *Cribado de diferentes compuestos antiparasitarios en adultos mediante microscopía*

Los adultos se obtuvieron por perfusión con PBS y heparina y se realizaron de 2 a 3 lavados con PBS estéril. Posteriormente, se colocó una pareja o un individuo en cada pocillo y se añadieron 7 µL de cada compuesto a una concentración de 2 mM para obtener una concentración final de 10 µM. Se utilizó DMSO al 1 % v/v como control negativo y PZQ a 10 µM como control positivo. La placa se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂, y se observó la caracterización fenotípica de los vermes en intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. La viabilidad se determinó mediante la asignación de puntuación: (3 = móvil), sin cambios en la morfología, con transparencia y tegumento intacto, ventosas ventral y oral activas y presencia de huevos; (2 = movilidad reducida), tegumento y ventosas intactas; (1 = movilidad casi nula) con cambios en el tegumento, deformación de las ventosas y alteración en la coloración; (0 = muerto), con coloración oscura, malformación de las ventosas y ausencia de motilidad.

3. RESULTADOS

3.1. *Cribado de diferentes compuestos antiparasitarios*

Se evaluaron 26 compuestos con estructuras diversas, todos dirigidos a la tubulina como diana biológica (Tabla 1). El compuesto 1 mostró una letalidad del 100 %, tanto en adultos como en esquistosómulas. En los controles, el PZQ no tuvo efecto sobre las esquistosómulas, mientras que las tratadas con auranofina mostraron inviabilidad total a las 24 horas. Adicionalmente, el compuesto 12 demostró actividad positiva en esquistosómulas, pero no en adultos, y el compuesto 20 mostró actividad positiva en adultos y una actividad moderada en esquistosómulas.

En el medio DMEM, las esquistosómulas se observaron bajo el microscopio como transparentes, móviles y con un tegumento liso, lo que indica un estado óptimo de viabilidad (*Figura 2 A*). Al ser tratadas con PZQ, se observó una disminución de la movilidad y una reducción en la transparencia (*Figura 2 B*). Con auranofina y con el compuesto 1, se notaron cambios en la morfología de las esquistosómulas a partir de las primeras 24 horas con ausencia de motilidad, tegumento dañado, color opaco y pérdida de transparencia (*Figura 2 C y 2 D*).

Compuesto/ Controles	Clase	Actividad esquistosómulas (10µM)	Viabilidad (% 72h)	Actividad Adultos (10µM)	Score (72h)
1	AT	(+)	0,0	(+)	0
2	AT	(-)	69,9	(-)	2
3	AT	(-)	77,8	(-)	3
4	AT	(-)	76,8	(-)	3
5	AT	(-)	56,2	(-)	2
6	AT	(-)	45,6	(-)	2
7	AT	(-)	60,4	(-)	3
8	AT	(-)	74,2	(-)	3
9	AT	(-)	83,4	(-)	3
10	AT	(-)	85,3	(-)	3
11	AT	(-)	76,4	(-)	2
12	AT	(+)	0,0	(-)	2
13	AT	(-)	69,7	(-)	2
14	AT	(-)	68,0	(-)	2
15	AT	(+/-)	26,1	(-)	2
16	AT	(-)	37,5	(-)	2
17	AT	(-)	79,6	(-)	3
18	AT	(-)	74,5	(-)	3
19	AT	(+/-)	13,5	(-)	1
20	AT	(+/-)	79,8	(+)	2
21	AT	(-)	68,0	(-)	2
22	AT	(-)	55,6	(-)	2
23	AT	(-)	54,5	(-)	2
24	AT	(-)	60,0	(-)	2
25	AT	(-)	84,5	(-)	3
26	AT	(-)	87,4	(-)	3
AURANOFINA	Control (+)	(+)	0,0	(+)	0
PZQ	Control (+)	(+/-)	-	(+)	0
DMSO	Control (-)	(-)	93,8	(-)	3
MEDIO (DMEM)	Control (-)	(-)	95,6	(-)	3

Tabla 1: Resumen de cribado de compuestos
 en esquistosómulas y en adultos (AT: Anti-tubulina).

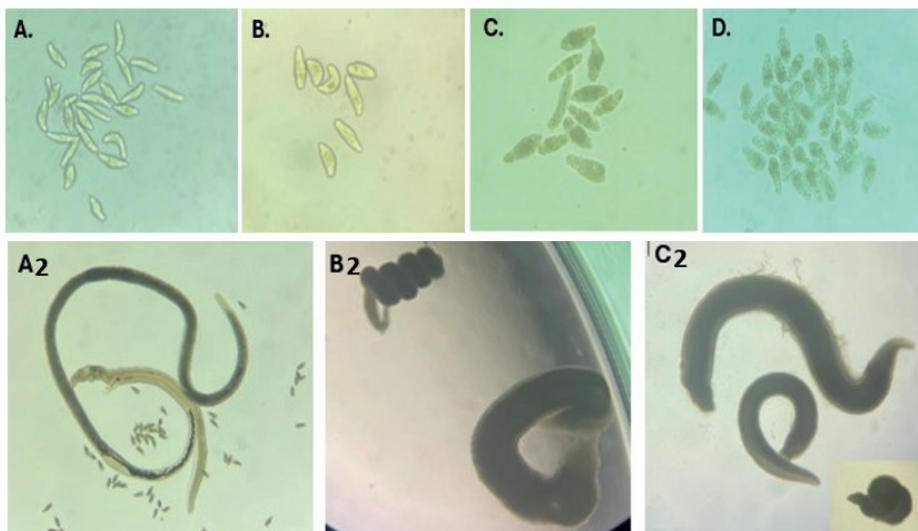


Figura 2: Diferenciación fenotípica de esquistosómulas: **A.** DMEM 1% v/v; **B.** PZQ a 10 μ M; **C.** Auranofina a 10 μ M; **D.** Compuesto 1 a 10 μ M, visualizadas con microscopio invertido a 20X. Y adultos: **A2.** Control negativo (DMEM al 1% v/v); **B2.** Control positivo (PZQ a 10 μ M); **C2.** Compuesto 1 a 10 μ M, visualización 4X microscopio invertido. Imágenes tomadas a las 72 horas.

En el cribado frente a adultos, el PZQ (control positivo) produjo letalidad en las primeras 24 horas, ocasionando daños en el tegumento, malformaciones en las ventosas oral y ventral, cambios de coloración y ausencia de motilidad (*Figura 2 B2*). La mayoría de los compuestos anti-tubulina no mostraron actividad y presentaron características fenotípicas similares al control negativo (DMSO) (*Figura 2 A2*). El compuesto 1 mostró actividad con efectos similares a los del PZQ en las primeras 24 horas (*Figura 2 C2*). Adicionalmente en algunos compuestos se observó una leve disminución de la motilidad (*Tabla 1*).

3.2. Cálculo de CL_{50} en esquistosómulas y adultos

Se compararon los valores de CL_{50} del compuesto 1 con los de los controles positivos. El compuesto 1 mostró un CL_{50} de 1.23 μ M en esquistosómulas, lo que indica buena efectividad en comparación con el control positivo, auranofina (0.14 μ M). En adultos, el CL_{50} fue de 3.46 μ M, también favorable respecto al control positivo PZQ (0.49 μ M). Estos resultados demuestran que el compuesto 1 es efectivo en ambas fases del parásito.

4. DISCUSIÓN

El praziquantel ha sido esencial en el control de la esquistosomosis, aunque su incapacidad para eliminar las formas juveniles del parásito reduce su eficacia a largo plazo. Este estudio se enfocó en la búsqueda y evaluación de nuevos compuestos antiparasitarios para *S. mansoni* empleando microscopía e inteligencia artificial.

El compuesto 1 presenta una estructura similar a la de la combretastatina A4 (CA4) y presumiblemente comparte un mecanismo de acción análogo basado en la inhibición de la polimerización de la tubulina. Este mecanismo implica la unión al sitio de acción de la colchicina en la subunidad beta. Tal inhibición previene la formación de microtúbulos, que son esenciales para diversas funciones celulares (Xia *et al.*, 2019). Dado que la tubulina es una proteína altamente conservada, se probó el compuesto en células humanas HeLa para confirmar su selectividad hacia la tubulina de los parásitos, demostrando que no es citotóxico a las concentraciones evaluadas. Lo que sugiere que podría ser seguro para estudios futuros en modelos murinos y, potencialmente, para aplicaciones clínicas. Los resultados obtenidos del compuesto 1 revelan valores de CL_{50} prometedores tanto para esquistosómulas como para adultos, con una mayor eficacia observada en las esquistosómulas. Esto es particularmente relevante, ya que el objetivo es identificar un compuesto que pueda complementar el tratamiento con PZQ, especialmente porque este muestra una eficacia reducida en las fases juveniles de *S. mansoni*. En estudios previos se han realizado cribados similares con una CL_{50} de 30 μ M y 64 μ M reportados en adultos (Botros *et al.*, 2019) y (Pereira *et al.*, 2019). Esto demuestra que la CL_{50} de 3.46 μ M para adultos del compuesto 1 tiene un gran potencial esquistosomicida. Por último, se comprobó que el PZQ no es eficaz contra los estadios juveniles. Aunque no provocó la muerte, sí generó deformaciones morfológicas, tal como se había reportado previamente (Frahm *et al.*, 2019).

5. CONCLUSIONES

Se ensayaron 20 compuestos con posible actividad antiparasitaria frente a *Schistosoma mansoni*, de los cuales cinco mostraron su actividad sobre esquistosómulas y dos sobre los estadios adultos. Entre ellos, el compuesto 1 destacó por su actividad frente a ambos estadios, alcanzando una letalidad del 100% y valores de CL_{50} prometedores. Estos resultados confirman su potencial como candidato para el desarrollo de nuevos tratamientos frente a la esquistosomosis. No obstante, serán necesarios estudios *in vivo* que permitan evaluar su eficacia, estabilidad, seguridad y su perfil farmacológico.

6. REFERENCIAS

- Botros SS, William S, Sabra ANA, El-Lakkany NM, Seif el-Din SH, García-Rubia A, *et al.* Screening of a PDE-focused library identifies imidazoles with *in vitro* and *in vivo* antischistosomal activity. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2019;9:35-43.
- Coeli R, Baba EH, Araujo N, Coelho PMZ, Oliveira G. Praziquantel treatment decreases *Schistosoma mansoni* genetic diversity in experimental infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(12):e2596.
- Colley DG, Secor WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2014;36(8):347-57.
- Cowan N, Keiser J. Repurposing of anticancer drugs: in vitro and in vivo activities against *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors.* 2015;8(1):417.
- Frahm S, Anisuzzaman A, Prodjinotho UF, Vejzagić N, Verschoor A, Prazeres Da Costa C. A novel cell-free method to culture *Schistosoma mansoni* from cercariae to juvenile worm stages for in vitro drug testing. Geary TG, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(1):e0006590.
- Lombardo FC, Pasche V, Panic G, Endriss Y, Keiser J. Life cycle maintenance and drug-sensitivity assays for early drug discovery in *Schistosoma mansoni*. *Nat Protoc.* 2019;14(2):461-81.
- Marxer M, Ingram K, Keiser J. Development of an in vitro drug screening assay using *Schistosoma haematobium* schistosomula. *Parasit Vectors.* 2012;5(1):165.
- Milligan JN, Jolly ER. Cercarial transformation and in vitro cultivation of *Schistosoma mansoni* schistosomules. *J Vis Exp JoVE.* 2011;(54):3191.
- Pereira ASA, Silveira GO, Amaral MS, Almeida SMV, Oliveira JF, Lima MCA, *et al.* In vitro activity of aryl-thiazole derivatives against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. *PLoS ONE.*;14(11):e0225425.
- Sun Q, Mao R, Wang D, Hu C, Zheng Y, Sun D. The cytotoxicity study of praziquantel enantiomers. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:2061-8.
- Vale N, Gouveia MJ, Rinaldi G, Brindley PJ, Gärtner F, Correia da Costa JM. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):10.1128/aac.02582-16.
- Vicente B, López-Abán J, Rojas-Caraballo J, del Olmo E, Fernández-Soto P, Muro A. Protection against *Schistosoma mansoni* infection using a *Fasciola hepatica*-derived fatty acid binding protein from different delivery systems. *Parasit Vectors.* 2016;9:216.
- Villamizar-Monsalve MA, López-Abán J, Vicente B, Peláez R, Muro A. Current drug strategies for the treatment and control of schistosomiasis. *Expert Opin Pharmacother.* 2024;25(4):409-20.
- Villamizar-Monsalve, M. A., Sánchez-Montejo, J., López-Abán, J., Vicente, B., Marín, M., Fernández-Ceballos, N., Peláez, R., & Muro, A. (2024). Development and Application of an In Vitro Drug Screening Assay for *Schistosoma mansoni* Schistosomula Using YOLOv5. *Biomedicines*, 12(12), 2894.
- Xia LY, Zhang YL, Yang R, Wang ZC, Lu YD, Wang BZ, *et al.* Tubulin Inhibitors Binding to Colchicine-Site: A Review from 2015 to 2019. *Curr Med Chem.* 2020;27(40):6787-814.