



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN FARMACIA

*Propiedades funcionales y farmacológicas de receptores Cys-loop de serotonina humano y del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Búsqueda de nuevos fármacos.*

NOELIA MARISOL RODRIGUEZ ARAUJO

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN FARMACIA

*Propiedades funcionales y farmacológicas de receptores Cys-loop de serotonina humano y del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Búsqueda de nuevos fármacos.*

NOELIA MARISOL RODRIGUEZ ARAUJO

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2023

Directora de Tesis

DOCTORA CECILIA BOUZAT

Profesora Titular de Farmacología II en la Universidad Nacional del Sur

Investigadora Superior de CONICET

Directora del INIBIBB

Co-director de Tesis

DOCTOR JEREMÍAS CORRADI

Asistente docente de Farmacología II en la Universidad Nacional del Sur

Investigador Adjunto de CONICET

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Farmacia de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia y el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el periodo comprendido entre el 21 de agosto de 2018 y mayo de 2023, bajo la dirección de la Doctora Cecilia Bouzat, Investigadora Superior de CONICET, Directora del INIBIBB y Profesora Titular de la Cátedra de Farmacología II, y bajo la Co-dirección del Doctor Jeremías Corradi, Investigador Adjunto de CONICET y Asistente docente de la cátedra de Farmacología II.

Rodriguez Araujo Noelia Marisol

Mayo de 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la calificación de/(.....).

A Maite y Damián

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Sur, por brindarme la posibilidad de poder acceder a mi formación académica de grado y de postgrado de excelente nivel y de manera gratuita. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haber financiado por completo mis estudios de Doctorado. Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) por haberme brindado el lugar para poder realizar mi Tesis Doctoral.

A mi directora, Dra. Cecilia Bouzat, por confiar en mí y haberme dado la oportunidad de desarrollar el presente trabajo de Tesis en el laboratorio. Por transmitirme todos sus conocimientos y experiencia. Por darme la posibilidad de crecer y aprender, brindándome su tiempo, apoyo y empatía en los momentos que más los necesité.

A mi codirector, Dr. Jeremías Corradi, por brindarme su tiempo, conocimiento y experiencia. Por enseñarme con paciencia y dedicación.

A todos los integrantes del laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular del INIBIBB, tanto Becarios como Investigadores, que me acompañaron en estos años de aprendizaje. A Carmen, Ari, Guille, Orne, Mati, Eli, Facu, Albano, Caro, Cami, Carli, Tami, Juli, Flor y Juan Pablo con los que compartí, durante todos estos años, excelentes jornadas de trabajo, charlas, mates, reuniones científicas, y los tan especiales "lunes dulces". Gracias por sus consejos y por ayudarme cada vez que lo necesité.

A todos los integrantes del INIBIBB, que realizaron su trabajo con dedicación y compromiso, en especial al personal de apoyo, por su excelente predisposición y amabilidad.

A mis amigas por escucharme, acompañarme y apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida, como también en mis momentos de felicidad.

A mi hermosa familia, mi papá Néstor; mi mamá Marisa; mi hermano Gerar; mi hermano Damián, mi estrella en el cielo que me guía y acompaña siempre; y mi hermana Ana. Gracias a cada uno, por estar siempre a mi lado, por su apoyo y amor incondicional,

por creer siempre en mí y demostrármelo, por acompañarme en cada paso que doy. No me alcanzan las palabras.

A mis queridos suegros, Alberto y Corina, por el apoyo constante y por ser mi segunda familia. Por estar siempre al pie del cañón.

A mis cuñas Lulú, Dani, Lore y Sergio por las charlas, los momentos compartidos y el apoyo, en especial a Vale, por haber cuidado a Maite con tanto amor y dedicación.

A mis hermosas y amadas sobrinas, Sol y Celi, por ser parte de mi vida y por todo su amor.

A Damián, mi gran compañero de vida, por su amor incondicional, su apoyo constante y por ser el pilar fundamental que me sostiene de pie todos los días de mi vida. Su presencia a mi lado, durante estos más de 15 años, fue y es esencial para mi desarrollo profesional y crecimiento personal. Gracias por sostenerme y contenerme en el momento más triste de mi vida. Gracias especialmente por lo más preciado y hermoso que tenemos, nuestra hija Maite.

Gracias a Maite, mi luz, mi TODO, no me alcanzan las palabras para agradecer su presencia en mi vida, y por todo lo que me enseña a diario. Gracias "Memi" Y Dami por darme el amor más puro que conocí en la vida. Gracias por darme FELICIDAD. Los Amo Infinitamente.

22 de mayo de 2023

Noelia Marisol Rodriguez Araujo

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

*Propiedades funcionales y farmacológicas de receptores Cys-loop de serotonina humano y del nematodo *Caenorhabditis elegans*.
Búsqueda de nuevos fármacos.*

RESUMEN

El sistema nervioso consiste en una red muy compleja de billones de neuronas que se comunican entre sí. Las sinapsis químicas son primordiales para la comunicación neuronal rápida y eficiente, y están mediadas por la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica para unirse a sus receptores específicos ubicados en otras células o neuronas postsinápticas.

Entre los receptores de neurotransmisores se encuentran los receptores *Cys-loop*, que pertenecen a la superfamilia de canales pentaméricos activados por ligando (pLGIC). Son proteínas integrales de membrana que convierten la señal química en una respuesta eléctrica al permitir el paso de iones de un lado a otro de la membrana. Estos receptores se constituyen por 3 regiones fundamentales, el dominio extracelular, donde se encuentra el sitio de unión del neurotransmisor o sitio ortostérico; el dominio transmembrana, que conforma el poro del canal y contiene los sitios de unión para diferentes moduladores alostéricos; y el dominio intracelular que posee sitios de modulación y aminoácidos determinantes de la conductancia del canal. En vertebrados, esta familia de receptores está formada por los receptores nicotínicos de acetilcolina y el receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃), los cuales son permeables a cationes, y por los receptores de ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_A) y receptores de glicina, permeables a aniones. El repertorio de receptores *Cys-loop* en invertebrados es más variado y extenso, incluyendo entre ellos un canal aniónico activado por serotonina, denominado MOD-1.

Los receptores *Cys-loop* son ampliamente estudiados por ser blancos moleculares terapéuticos en una extensa variedad de patologías. Es por ello por lo que

ampliar el conocimiento de la función y modulación de estos receptores permitirá generar mejores estrategias farmacológicas.

En esta Tesis Doctoral se realizaron estudios de la función y modulación de los receptores *Cys-loop* activados por serotonina humano, 5-HT₃, y de *Caenorhabditis elegans*, MOD-1, para la búsqueda de nuevos fármacos y la generación de estrategias de reposicionamiento de medicamentos de uso clínico.

En el **Capítulo 1** se estudió la funcionalidad molecular del receptor 5-HT_{3A} humano. Se logró descifrar las diferencias entre la activación ortostérica y la activación y modulación alostérica por terpenoides, utilizando la valiosa técnica de *patch-clamp*. Se definieron las bases mecanísticas de la activación de 5-HT_{3A} por los agonistas ortostéricos serotonina y triptamina, y de la activación alostérica por los terpenoides timol y carvacrol. Se demostró que triptamina es un agonista de muy baja eficacia y potencia. Mediante registros de *whole-cell*, se demostró que los terpenoides potencian las corrientes evocadas por serotonina, pero también poseen capacidad para evocar alostéricamente respuestas macroscópicas, con mayor potencia y eficacia que triptamina, aunque de forma más lenta que serotonina. Mediante registros de canal único, se evidenció que dichos compuestos activan al receptor 5-HT₃ como agonistas muy eficaces dado que generan episodios de activación más prolongados que serotonina. Nuestro estudio mostró la primera caracterización a nivel de canal único de la activación de 5-HT_{3A} humano por ligandos alostéricos, de creciente interés como herramientas terapéuticas.

En el **Capítulo 2** se halló un nuevo blanco promisorio para la terapia antihelmíntica, estudiando ampliamente al receptor MOD-1 de *C. elegans*. Este nematodo es un buen modelo parasitario ya que comparte las características funcionales y farmacológicas con los nematodos parasitarios. Además *C. elegans* es sensible a la mayoría de los fármacos antiparasitarios que están dirigidos a los receptores *Cys-loop* de los parásitos. Dado que MOD-1 está ausente en vertebrados, se encuentra limitado al filo, y está presente en nematodos parasíticos, emerge como un blanco farmacológico promisorio.

En este capítulo se revelaron las diferencias en la selectividad agonista y en los sitios ago-PAM entre MOD-1 y el receptor de serotonina humano 5-HT₃. Se encontró que la triptamina, un agonista muy parcial de 5-HT₃A, es un agonista eficaz de MOD-1, y se demostró además que posee una acción antihelmíntica. Por otro lado, se realizó un testeó de una variedad de compuestos en búsqueda de nuevos moduladores de MOD-1. Se demostró, mediante estudios electrofisiológicos, que muscimol y piperazina (PZE) son antagonistas no competitivos de MOD-1. Mediante ensayos de comportamiento en gusanos se confirmó el efecto de PZE sobre MOD-1, hallando de esta manera un nuevo blanco molecular para este fármaco de uso antiparasitario.

Estos estudios ampliaron el conocimiento de receptores *Cys-loop* de nematodos para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad nematicida. Por lo tanto, se concluye que, derivados de triptamina y PZE podrían ser explorados como nuevos compuestos con potencial actividad antiparasitaria.

En el **Capítulo 3**, se comenzó a plantear estrategias para reposicionar medicamentos de uso clínico, para lograr superar las desventajas de generar un fármaco de *novo*, acortando los tiempos y recursos necesarios para realizar los estudios farmacológicos, farmacocinéticos y de toxicidad requeridos para la producción de nuevos fármacos dirigidos a tratar patologías en las que los receptores estudiados en esta Tesis están involucrados. Con tal fin, se exploró el efecto de fármacos de uso comercial derivados de triptamina y PZE, debido a lo postulado en el capítulo 2, y se encontró que sumatriptan, un fármaco comercializado para tratar la migraña, sería un buen candidato para reposicionar para la terapia antiparasitaria. Además, PZE podría reutilizarse como modulador alostérico negativo de los receptores 5-HT₃A humano abordando patologías en las que este receptor está involucrado, tales como náuseas y vómitos relacionados a la quimioterapia, radioterapia y anestesia, así como para mitigar los síntomas del síndrome de intestino irritable y para patologías del sistema nervioso como depresión, ansiedad y esquizofrenia, entre otras en las que este receptor está involucrado.

En resumen, aprovechando la potencialidad que brindan los registros de canal único y de corrientes macroscópicas en el estudio de las bases moleculares del funcionamiento y modulación de estos receptores *Cys-loop*, se logró hallar un nuevo blanco antiparasitario, descifrar por primera vez las diferencias de activación ortostérica

y alostérica del receptor 5-HT_{3A} humano por timol y carvacrol, y generar estrategias de reposicionamiento de fármacos de uso clínico mediante la modulación alostérica de estos receptores tanto en *C. elegans* como en humano.

Estos estudios amplían el conocimiento de la función y modulación de los receptores *Cys-loop*, generando una base para abordar patologías que involucran a estos receptores y para el desarrollo de nuevos y más selectivos fármacos.

SUMMARY

The nervous system consists of a highly complex network of billions of neurons that communicate with each other. Chemical synapses are key to the rapid and efficient neuronal communication and are mediated by the release of neurotransmitters into the synaptic cleft to bind to their specific receptors located either on other cells or postsynaptic neurons.

Among the neurotransmitter receptors are the Cys-loop receptors, which belong to the superfamily of ligand-gated pentameric channels (pLGIC). They are integral membrane proteins that convert the chemical signal into an electrical response by allowing ions to pass from one side of the membrane to the other. These receptors are made up of 3 fundamental regions: the extracellular domain, where the neurotransmitter binding site or orthosteric site is located; the transmembrane domain, which forms the channel pore and contains the binding sites for different allosteric modulators; and the intracellular domain which contains modulation sites and amino acids that determine channel conductance. In vertebrates, this family of receptors consists of the nicotinic acetylcholine receptors and the serotonin receptor type 3 (5-HT₃), both of which are permeable to cations, and the receptors for γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) and glycine receptors, permeable to anions. The repertoire of Cys-loop receptors in invertebrates is more varied and extensive, including among them, a serotonin-activated anion channel called MOD-1.

Cys-loop receptors have been extensively studied as they are therapeutic molecular targets in a wide variety of pathologies. Expanding our knowledge on the function and modulation of these receptors will therefore contribute to generating better pharmacological strategies for the treatment of these disorders.

In this Ph. D. thesis studies were carried out on the function and modulation of the Cys-loop receptors activated by human serotonin, 5-HT₃, and of *Caenorhabditis elegans*, MOD-1, for the search for new drugs and the generation of repositioning strategies for drugs for clinical use.

In **Chapter 1** the molecular functionality of the human 5-HT_{3A} receptor was studied. It was possible to decipher the differences between orthosteric activation and allosteric activation and modulation by terpenoids, using the valuable patch-clamp technique. The mechanistic bases of 5-HT_{3A} activation by the orthosteric agonists serotonin and tryptamine, and allosteric activation by the terpenoids thymol and carvacrol, were defined. It is revealed that tryptamine is an agonist with very low efficacy and potency. Using whole-cell recordings, they show that terpenoids not only potentiate the currents evoked by serotonin but also have the ability to allosterically evoke macroscopic responses, with greater power and efficiency than tryptamine, although more slowly than serotonin. Using single channel recordings, these compounds were shown to activate the 5-HT_{3A} receptor as highly effective agonists, since they generate longer episodes of activation than serotonin. Our study showed the first characterization at the single channel level of the activation of human 5-HT_{3A} by allosteric ligands, of increasing interest as therapeutic tools.

In **Chapter 2**, a promising new target for anthelmintic therapy was found by extensively studying the MOD-1 receptor of *C. elegans*. This nematode is a good parasitic model since it shares functional and pharmacological characteristics with parasitic nematodes. In addition, *C. elegans* is sensitive to most antiparasitic drugs that are directed at the Cys-loop receptors of the parasites. Since MOD-1 is absent in vertebrates, limited to the phylum, and present in parasitic nematodes, it emerges as a promising drug target.

In this chapter we revealed the differences in agonist selectivity and ago-PAM sites between MOD-1 and the human serotonin 5-HT₃ receptor. Tryptamine, a very partial agonist of 5-HT_{3A}, was found to be an effective agonist of MOD-1, and was further shown to have an anthelmintic action. On the other hand, we carried out a test of a variety of compounds in search of new modulators of MOD-1. We demonstrated by means of electrophysiological studies that muscimol and piperazine (PZE) are non-competitive antagonists of MOD-1. Also, through behavioral tests in worms, we confirmed the effect of PZE on MOD-1, thus finding a new molecular target for this drug for antiparasitic use.

These studies have considerably expanded the knowledge of nematode Cys-loop receptors for the discovery of new compounds with nematicidal activity. We conclude that tryptamine and PZE derivatives could be explored as new compounds with potential antiparasitic activity.

In **Chapter 3**, we began to propose strategies to reposition drugs for clinical use in order to overcome the disadvantages of generating a new drug, shortening the time and resources necessary to perform the pharmacological, pharmacokinetic, and toxicity studies required for the production of new drugs aimed at treating pathologies in which the receptors studied in this Ph. D. thesis are involved. To this end, the effect of drugs in commercial use derived from tryptamine and PZE was explored based on the results collected in Chapter 2. It was found that sumatriptan, a drug marketed to treat migraine, appears to be a good candidate to reposition for antiparasitic therapy. In addition, PZE could be reused as a negative allosteric modulator of human 5-HT_{3A} receptors, addressing pathologies in which this receptor is involved, such as nausea and vomiting related to chemotherapy, radiotherapy, and anesthesia, as well as to alleviate the symptoms of irritable bowel syndrome and for pathologies of the nervous system, such as depression, anxiety and schizophrenia, among others in which this receptor is involved.

Summing up, taking advantage of the potential offered by single channel recordings and macroscopic currents in the study of the molecular bases of the functioning and modulation of the Cys-loop receptors explored in this Ph. D. thesis, it was possible to: i) find a new antiparasitic target, ii) to decipher for the first time the differences of orthosteric and allosteric activation of the human 5-HT_{3A} receptor by thymol and carvacrol, and iii) to generate drug repositioning strategies for clinical use through allosteric modulation of these receptors in both *C. elegans* and humans.

These studies broaden the knowledge of the function and modulation of Cys-loop receptors, generating a basis for addressing pathologies that involve these receptors as well as for developing new and more selective drugs.

Índice

PREFACIO	I
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	I
SUMMARY	V
INTRODUCCIÓN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Sinapsis	2
Neurotransmisores	4
Serotonina	4
Receptores de neurotransmisores postsinápticos.....	6
Estructura general de los receptores <i>Cys-loop</i>	8
Dominio extracelular	9
Dominio Transmembrana	10
Dominio Intracelular	12
Cambios conformacionales y respuesta de los receptores <i>Cys-loop</i>	14
Receptores de serotonina humanos y de <i>Caenorhabditis elegans</i> como blancos farmacológicos	19
Receptor de serotonina tipo 3 (5-HT ₃) humano: expresión y rol fisiológico	21
Estructura de 5-HT ₃	22
Farmacología del receptor 5-HT ₃	23
Receptor MOD-1 de <i>C. elegans</i> : expresión y rol fisiológico.....	24
<i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo	26
Filo Nematoda	28
Características generales de <i>C. elegans</i>	29
Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	32
Antihelmínticos: Búsqueda de nuevos blancos.	34
MATERIALES Y MÉTODOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Cepas de <i>C. elegans</i>	39
Cultivo y mantenimiento de <i>C. elegans</i> :	39
Congelamiento y descongelamiento de gusanos	41
Transferencia de gusanos en placas	42
Sincronización de cultivos.....	42
Ensayo de motilidad de <i>C. elegans</i>	43
Ensayo de movilidad en medio líquido	44
Aislamiento y cultivo primario de larvas L1 de <i>C. elegans</i>	44

Aislamiento y cultivo primario de larvas L2-L3 de <i>C. elegans</i>	45
Subclonación de cDNA de MOD-1 en el vector pcDNA 3.1.....	47
Expresión heteróloga de receptores.....	47
Registros de <i>patch-clamp</i>	48
Registros de canal único	49
Corrientes macroscópicas.....	51
Microscopía.....	56
Drogas	56
Análisis estadístico	56
CAPÍTULO I	57
INTRODUCCIÓN.....	58
OBJETIVO GENERAL	62
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
RESULTADOS	63
Activación del receptor humano 5-HT _{3A_{HC}} por ligandos ortostéricos y alostéricos evaluada mediante corrientes macroscópicas.....	63
Potenciación del receptor 5-HT _{3A_{HC}} humano por carvacrol y timol evaluada a nivel macroscópico	66
Activación del receptor 5-HT _{3A_{HC}} humano por agonistas ortostéricos evaluado a nivel de canal único	68
Activación del receptor 5-HT _{3A_{HC}} humano por ligandos alostéricos evaluada a nivel de canal único	74
Potenciación del receptor 5-HT _{3A_{HC}} humano por carvacrol y timol evaluada a nivel de canal único	75
DISCUSIÓN	78
CAPÍTULO II	83
INTRODUCCIÓN.....	84
OBJETIVO GENERAL	89
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	89
RESULTADOS	90
Estudios electrofisiológicos de MOD-1 en células musculares y neuronales de <i>C. elegans</i>	90
Registros de corrientes macroscópicas activadas por 5-HT en células L1.....	91
Registros de canal único en células L1	94
Estudios electrofisiológicos de MOD-1 expresado en forma heteróloga en células de mamífero.....	95
Buscando activadores de MOD-1	98
Modulación farmacológica del receptor MOD-1.....	100
Efectos de la modulación de MOD-1 en el comportamiento del gusano.....	105
DISCUSIÓN	111

CAPÍTULO III	118
INTRODUCCIÓN.....	119
OBJETIVO GENERAL	121
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	121
RESULTADOS	122
Efectos de derivados de PZE y triptamina sobre receptores MOD-1	122
Efecto modulador de PZE sobre el receptor 5-HT _{3AHC} evaluado a nivel de corrientes macroscópicas	124
Efecto modulador de PZE en el receptor 5-HT _{3AHC} evaluado a nivel de canal único	126
Efectos de derivados de PZE y derivados de triptamina sobre receptores 5-HT _{3AHC}	128
DISCUSIÓN	130
CONCLUSIONES GENERALES	133
Abreviaturas.....	136
BIBLIOGRAFÍA.....	139
PUBLICACIONES	152
TRABAJOS EN PROCESO DE REVISIÓN	152
TRABAJOS AVANZADOS EN PROCESO DE ENVÍO A PUBLICAR.....	152



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Sinapsis

Las neuronas son las células del sistema nervioso encargadas de la comunicación rápida y precisa de la información. Poseen un cuerpo celular o soma, y ramas especializadas llamadas dendritas, por las cuales reciben impulsos sinápticos desde otras neuronas; y axones, a través de los cuales se transmite información desde el soma a otras neuronas o células efectoras. La membrana de la superficie neuronal posee una gran cantidad de canales iónicos, que permiten que los iones fluyan de un lado a otro de la membrana celular. Algunos de estos canales son dependientes de voltaje, los cuales permiten que la neurona produzca una señal rápida denominada “potencial de acción”, que es la forma más rápida de conducción de señales eléctricas intracelulares (Lovinger, 2008).

El humano contiene al menos 100 mil millones de neuronas, mientras que el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* posee solo 302 neuronas, cada una se comunica entre sí o con muchas otras células, mediante un mecanismo altamente sofisticado y eficiente de comunicación llamado sinapsis. Las sinapsis se dividen generalmente en dos clases, sinapsis químicas y sinapsis eléctricas.

La comunicación de célula a célula mediada por neurotransmisores (NT) es la denominada sinapsis química. En ella, los neurotransmisores son liberados por neuronas presinápticas, a causa de una entrada de calcio (Ca^{2+}) a través de canales dependientes de voltaje; este aumento transitorio de Ca^{2+} en el terminal presináptico provoca que las vesículas sinápticas, que almacenan los neurotransmisores, se fusionen con la membrana plasmática presináptica y se libere su contenido (exocitosis) en la hendidura sináptica, un espacio de 20 a 30 nm de longitud entre las células presinápticas y postsinápticas. Los NT se unen a receptores específicos que se localizan en la membrana de la neurona postsináptica, induciendo en esta última un cambio en su potencial de membrana por medio de canales iónicos, y ocasionando una despolarización

(excitación) o hiperpolarización (inhibición) del potencial postsináptico, incrementando o disminuyendo la probabilidad de que dicha neurona postsináptica gatille un potencial de acción. La finalización de la sinapsis se da por remoción de los NT de la hendidura, mediante recaptación por transportadores celulares o por enzimas que los degradan. Este tipo de sinapsis es muy rápido, del orden de los milisegundos, y posee las ventajas de permitir la amplificación de la señal, la reversión de la polaridad neuronal y un gran potencial para la modulación, todas propiedades importantes para las funciones superiores del cerebro (Bouzat, 2012; Purves et al., 2001).

Las sinapsis eléctricas son más simples y más rápidas que las sinapsis químicas y presentan menor plasticidad (Purves et al., 2001). Las membranas de dos células que se comunican, se encuentran muy cercanas y estrechamente unidas entre sí por proteínas tubulares llamadas conexinas, que forman uniones en hendidura o “*gap junctions*”, las cuales poseen canales (conexones) emparejados y alineados con precisión en las membranas de las neuronas presinápticas y postsinápticas, de modo que cada par de canal forma un poro. De este modo, una variedad de iones puede difundir entre ambas células (Figura 1).

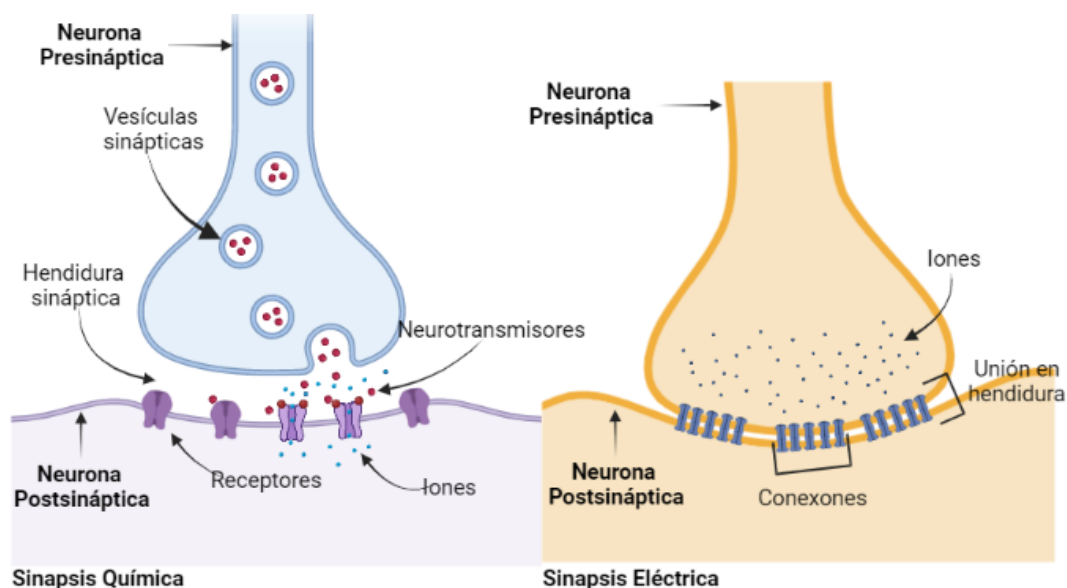


Figura 1. Esquema general de los tipos de sinapsis con sus componentes. Izquierda: sinapsis química. Derecha: sinapsis eléctrica.

Neurotransmisores

Los neurotransmisores en el cerebro pueden ser moléculas orgánicas pequeñas, como aminoácidos (glutamato y glicina), histamina, serotonina, o péptidos (Lovinger, 2008).

En términos generales, los NT son moléculas químicas, que son sintetizadas y almacenadas en vesículas en la neurona presináptica. Una vez liberados se unen a sus receptores específicos en la célula postsináptica, y dependiendo del receptor presente en dicha célula, un mismo neurotransmisor puede conducir a la apertura o cierre de los canales iónicos postsinápticos. Los cambios en la conductancia que aumentan la probabilidad de disparar un potencial de acción son excitatorios, mientras que los que disminuyen la probabilidad de generar un potencial de acción son inhibitorios.

Los criterios que definen un neurotransmisor son: i) la sustancia debe estar presente dentro de la neurona presináptica; ii) la sustancia debe liberarse en respuesta a la despolarización presináptica y la liberación debe ser dependiente de Ca^{2+} ; iii) los receptores específicos para la sustancia deben estar presentes en la célula postsináptica (Purves et al., 2001).

Serotonina

La serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) es una monoamina que pertenece a la clase de neurotransmisores. Se identificó por primera vez en el intestino y se denominó “enteramina”, y más tarde fue redescubierta en el suero de vaca como una sustancia que causa la contracción de los vasos sanguíneos y se la denominó “serotonina” (“sero” por ser encontrada en el suero y “tonina” por su efecto tónico sobre los vasos sanguíneos) (Rapport et al., 1948). Es producida por pequeños grupos de neuronas. La biosíntesis de 5-HT se produce a partir de triptófano que es un aminoácido que se obtiene a partir de la ingesta nutricional, mediante dos pasos enzimáticos: i) la

hidroxilación del triptófano a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), y ii) la descarboxilación de la cadena lateral de aminoácidos aromáticos por una L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC) transforma el 5-HTP en 5-HT (Figura 2). Una vez sintetizada, la 5-HT es transportada mediante un transportador vesicular de monoaminas a las vesículas para luego ser transportada a las terminales neuronales. La 5-HT extracelular es recaptada por un transportador de serotonina (SERT, por sus siglas en inglés), para luego ser re-empaquetada para ser reutilizada o ser metabolizada por la monoamino oxidasa (MAO). Esta vía se conserva en una amplia gama de vertebrados como los humanos, invertebrados, y en nematodos como *C. elegans* (Guzel y Mirowska-Guzel, 2022; Ishita et al., 2020; Purves et al., 2001).

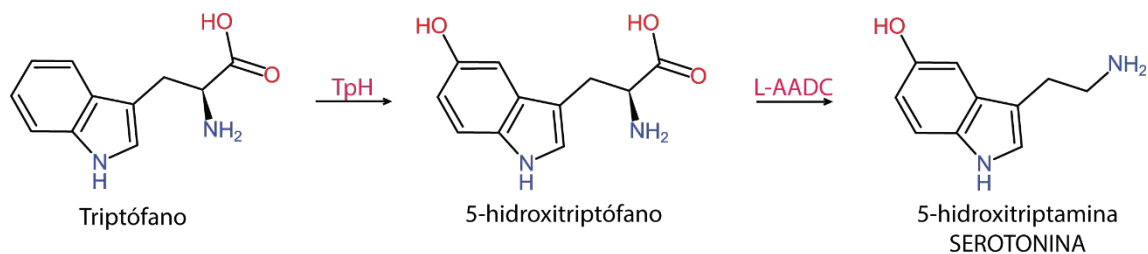


Figura 2. Síntesis de la serotonina. El triptófano es incorporado por la dieta y transformado en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por la enzima triptófano hidroxilasa. Luego, mediante la L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC), se transforma el 5-HTP en serotonina (5-HT).

La serotonina es un neurotransmisor altamente conservado a lo largo de la filogenia, con una amplia función neuromoduladora del comportamiento de distintas especies. La serotonina desempeña un rol en el sistema nervioso, y está involucrada en varias funciones y comportamientos fisiológicos de las distintas especies como la alimentación, el sueño, el aprendizaje, la ansiedad (Rao et al., 2023). En *C. elegans* en particular modula comportamientos con el bombeo faríngeo, la puesta de huevos, la locomoción, el apareamiento y el aprendizaje aversivo (Horvitz et al., 1982; Loer y Kenyon, 1993; Sawin et al., 2000; Y. Zhang et al., 2005).

La desregulación de este sistema está implicada en una gran cantidad de trastornos.

Receptores de neurotransmisores postsinápticos

Los receptores de neurotransmisores son proteínas integrales de membrana que poseen un dominio específico y de alta afinidad por el NT, que se activan y generan una respuesta específica en la célula en la que están integrados. Existen dos grandes grupos de receptores postsinápticos: los receptores metabotrópicos y los receptores ionotrópicos.

Los receptores metabotrópicos son receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G (*G-Protein Coupled Receptors, GPCR*). La unión del neurotransmisor a estos receptores activa las proteínas G, que luego se disocian del receptor e interactúan directamente con los canales iónicos o uniéndose a otras proteínas efectoras que producen mensajeros intracelulares que eventualmente abren o cierran los canales iónicos. Por lo tanto, su respuesta involucra diversas cascadas de señalización intracelular y genera respuestas del orden de los segundos, es decir de tipo lenta. Estos receptores son especialmente importantes en la regulación del comportamiento.

Los receptores ionotrópicos, en cambio, generan respuestas rápidas del orden de los milisegundos. Son proteínas de membrana que forman un canal que permite el paso de iones de un lado al otro de la membrana luego de su activación generada por la unión de un ligando (NT), y se agrupan en una gran familia denominada “Canales Iónicos Activados por Ligandos (*Ligand Gated Ion Channels, LGIC*).

Existen tres superfamilias pertenecientes a LGIC (Le Novère y Changeux, 2001):

- Los canales activados por ATP: los receptores P2X pertenecen a esta familia y son canales permeables a cationes Na^+ y Ca^{2+} . Están constituidos por tres subunidades homólogas, con dos segmentos transmembrana cada una, sus extremos amino-terminal (NH_2) y carboxilo-terminal (COOH) intracelulares, y un gran *loop* extracelular.
- Los canales catiónicos activados por glutamato: pertenecen a esta familia los receptores AMPA, kainato y NMDA. Están constituidos por cuatro subunidades

homólogas, cada una compuesta por un segmento NH₂-terminal, tres segmentos transmembrana y un segmento COOH-terminal.

- La superfamilia de receptores “*Cys-loop*”: son canales iónicos activados por neurotransmisores responsables de la transmisión excitatoria e inhibitoria rápida en el sistema nervioso central y periférico. Estos receptores están conformados por cinco subunidades homólogas que se disponen de manera pseudo-simétrica alrededor de un poro o canal central. Cada una de las cuales contiene un segmento NH₂-terminal, cuatro segmentos transmembranales, un gran *loop* intracelular, y un segmento COOH-terminal extracelular. El nombre de esta familia deriva de la existencia de un puente disulfuro entre dos cisteínas separadas por 13 aminoácidos en el dominio NH₂-terminal, que forman el “*Cys-loop*” (Hernando et al., 2012; Thompson et al., 2010). Luego del descubrimiento de receptores pentaméricos en bacterias, homólogos a los receptores *Cys-loop* pero que carecen del puente disulfuro, se dio el nombre de Canales iónicos Pentaméricos Activados por Ligando (pLGIC) a la superfamilia, y la familia de receptores *Cys-loop* pasó a ser parte de ella. En vertebrados, la familia de receptores *Cys-loop* está integrada por los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) y el receptor de 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃), los cuales son permeable a cationes, y generan transmisiones sinápticas excitatorias rápidas; y por los receptores de ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_A) y receptores de glicina, los cuales son permeables a aniones, precisamente al ion cloruro (Brown et al., 2006; Hernando et al., 2012). En invertebrados, el repertorio de receptores *Cys-loop* es más variado y extenso, ya que existen canales aniónicos activados por ACh, 5-HT, y glutamato.

Los receptores *Cys-loop* son los blancos de muchos fármacos utilizados actualmente en clínica, incluidos anestésicos, relajantes musculares, insecticidas, antihelmínticos y un amplio repertorio de fármacos para el tratamiento de desórdenes neurológicos como la enfermedad de Alzheimer, ansiedad, epilepsia, déficit de atención, depresión y adicción a drogas. Por lo que es de gran importancia comprender sus mecanismos moleculares de activación y modulación para el diseño y desarrollo de nuevos y más selectivos fármacos. Estos receptores fueron estudiados en esta Tesis.

Estructura general de los receptores *Cys-loop*

Los receptores *Cys-loop* se pueden dividir en receptores homoméricos, cuando las cinco subunidades que lo forman son idénticas; o receptores heteroméricos, cuando están formados por dos o más (de las cinco) subunidades diferentes. La estructura general de estos receptores consta de 3 dominios característicos. Cada receptor tiene un dominio extracelular (ECD, del inglés *extracellular domain*) que contiene los sitios de unión del ligando, un dominio transmembrana (TMD, del inglés *transmembrane domain*) que forma el poro que permite que los iones atraviesen la membrana, un dominio intracelular (ICD, del inglés *intracellular domain*) que desempeña un papel en la conductancia del canal y la modulación del receptor, y una región de acoplamiento en la interface entre la región extracelular y la región transmembrana esencial para el acoplamiento entre la unión del agonista y la apertura del canal (Bouzat et al., 2004; Thompson et al., 2010) (Figura 3).

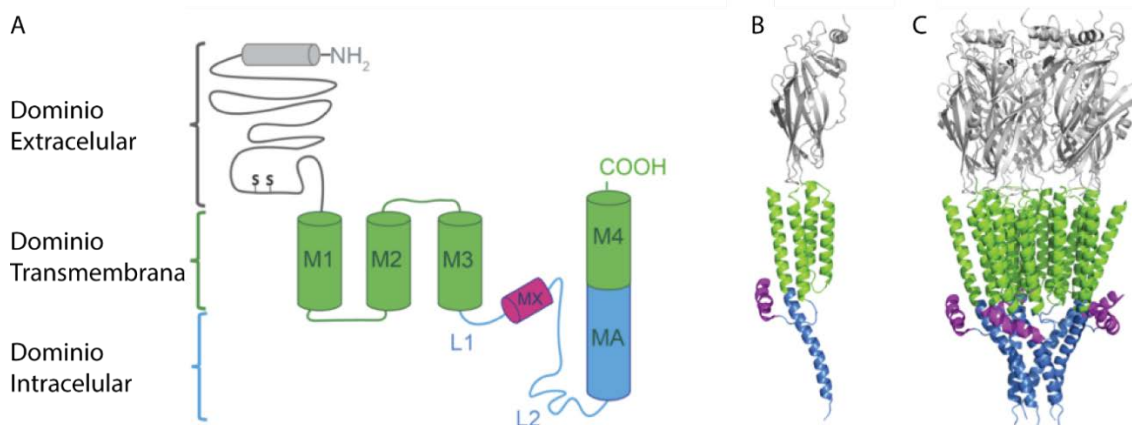


Figura 3. Estructura del receptor 5-HT_{3A}. (A) Esquema de una subunidad individual que ilustra la organización de los tres dominios, extracelular (gris), transmembrana (verde) con cuatro segmentos α -helicoidales (M1 a M4) e intracelular (azul y magenta) con una longitud de 17 aminoácidos. Una hélice MX y una hélice MA de 31 aminoácidos de longitud continua con la hélice transmembrana M4 subsiguiente. (B) Vista lateral de una subunidad individual. (C) Vista lateral del receptor. Imagen modificada de Quynh Do y Jansen, 2023.

Dominio extracelular

La estructura terciaria del dominio extracelular de cada subunidad consiste en una hélice α en el extremo N-terminal, seguida de dos hélices 3_{10} cortas y un núcleo de diez láminas u hojas plegadas β formando un núcleo β -sándwich. La lámina β interna están formadas por $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 8$, y la externa por $\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 9$ y $\beta 10$. Las hojas plegadas β se conectan entre sí mediante *loops*, numerados del 1 (hélice α a lámina $\beta 1$) al 10 (láminas $\beta 9$ - $\beta 10$). El *loop 7*, que une las láminas $\beta 6$ y $\beta 7$ contiene el “*Cys-loop*” que le otorga el nombre a esta superfamilia de receptores. La hoja plegada $\beta 10$ se continúa con el inicio del primer segmento transmembrana. La estructura del ECD está notablemente bien conservada en los pLGIC (Brejc et al., 2001; Thompson et al., 2010).

El sitio de unión ortostérico, que une agonistas o antagonistas competitivos, es una cavidad o bolsillo que se genera en la interfaz entre los ECD de dos subunidades adyacentes. Cada una de las subunidades contribuye con tres *loops*: los *loops* A, B y C constituyen la cara principal (+); y la subunidad conformada por los *loops* D, E, F y G constituyen la cara complementaria (-) del sitio de unión del agonista ortostérico (A. J. Thompson and S. C. R. Lummis, 2007; Hassaine et al., 2014; Thompson et al., 2010) (Figura 4).

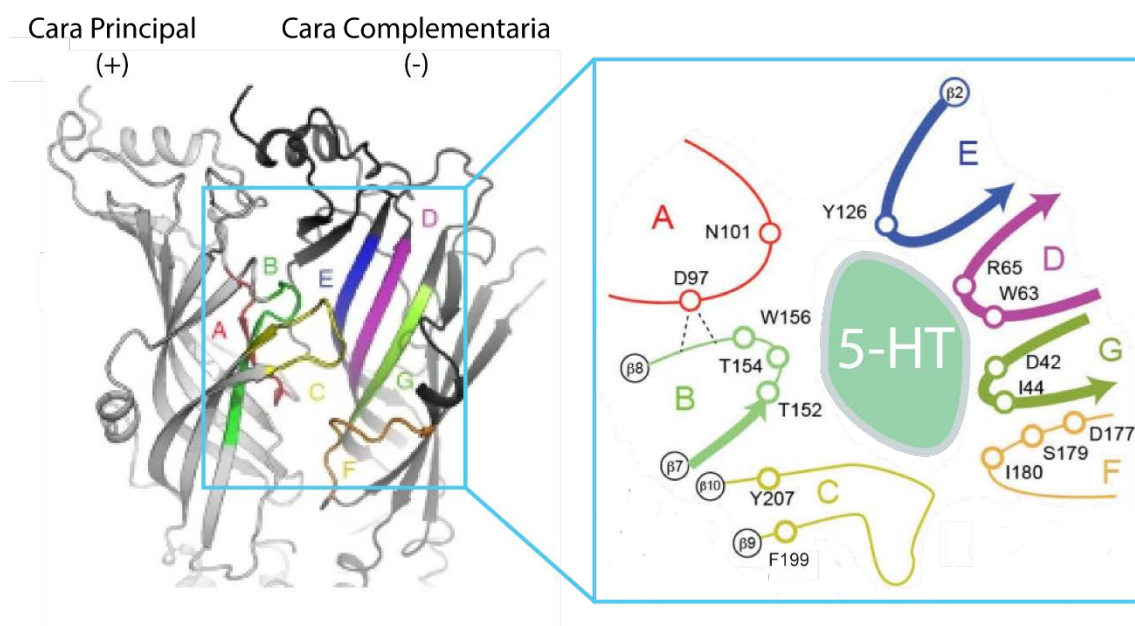


Figura 4. Dominio extracelular del receptor 5-HT_{3A}. A la izquierda de la figura se muestra un modelo de interfaz entre los ECD de dos subunidades del receptor basado en la estructura del receptor 5-HT_{3A} de ratón (PDB ID 4PIR; Hassaine et al., 2014). La subunidad de la izquierda es la que aporta la cara principal del sitio ortostérico (loops A, B y C). La subunidad de la derecha aporta la cara complementaria del sitio ortostérico (loops D, E, F y G). A la derecha de la figura, vista ampliada del diagrama del sitio ortostérico de unión de la 5-HT en el receptor 5-HT_{3A}, resaltando los residuos que interaccionan con el agonista.

Dominio Transmembrana

El dominio transmembrana de cada subunidad está formado por cuatro segmentos transmembrana, formado por cuatro segmentos α -hélices cortos e hidrofóbicos, M1-M4. La región transmembrana M2 de cada subunidad forma un anillo interno que forma las paredes del poro del canal iónico. El poro contiene un filtro de selectividad, una estructura capaz de determinar el tipo de ion que es capaz de atravesar el canal. Las demás hélices (M1, M3 y M4) se disponen externamente formando un anillo externo que separa el poro de los lípidos de la membrana plasmática (Bouzat, 2012).

Las hélices M2 de cada una de las cinco subunidades delimitan el poro iónico, de modo que las paredes del canal iónico quedan conformadas por anillos pentaméricos de residuos de aminoácidos, generalmente homólogos, superpuestos de manera sucesiva y estratificada. La organización estructural y funcional del canal iónico para los pLGICs constituye anillos externos, hidrofóbicos, polares, intermedios e internos. Para identificar la posición de estos residuos de M2, se les asignó una numeración de 0' a 20', comenzando por el residuo más abajo en la membrana (0') hasta el residuo más cercano a la parte extracelular de la membrana (20'). Para la familia pLGICs, el canal se inicia con un anillo externo o extracelular en 20', generalmente incluye residuos polares; en 5-HT_{3A} es D271 o D20', un residuo cargado negativamente, que facilita la selectividad de cationes por atracción electrostática y ocurre en los receptores permeables a los mismos. Luego el poro es continuado por una serie de anillos hidrofóbicos en L9', V13'

e I17' (L260, V264 e I268 para 5-HT₃A), con residuos hidrofóbicos altamente conservados a través de los pLGICs. L260 o L9' se dispone en el centro del poro, en la parte más estrecha del poro. Esta región de anillos hidrofóbicos es la denominada compuerta o *gate* de activación del canal iónico. La orientación de estos residuos, en las 5 subunidades de M2, determina una zona estrecha a lo largo del poro iónico, la cual impide el paso de iones en estado hidratado (diámetro de ~8 Å para Na⁺ y K⁺) que es el estado en el cual los iones atraviesan el canal. Para 5-HT₃A este embudo de constricción hidrofóbica que impide el paso de iones, es de 4,6 Å y se encuentra a nivel de L9' (L260). Luego de la compuerta se encuentran anillos polares; en 5-HT₃A este par de residuos está formado por S2' y T6', con una constricción de 5 Å a nivel de S2'. E250 o E-1' forma el segundo anillo con carga negativa en el extremo citoplasmático de la hélice M2, este glutamato se conserva en varias subunidades de nAChR. E-1' constituye el filtro de selectividad del canal, ya que forma complejos transitorios con los cationes para sustituir parcialmente a las moléculas de agua que los hidratan. De este modo, disminuyen la barrera energética para la translocación exitosa de los cationes a través del poro iónico (Basak et al., 2018; Gibbs y Chakrapani, 2021a; Hassaine et al., 2014; Nemezc et al., 2016) (Figura 5).

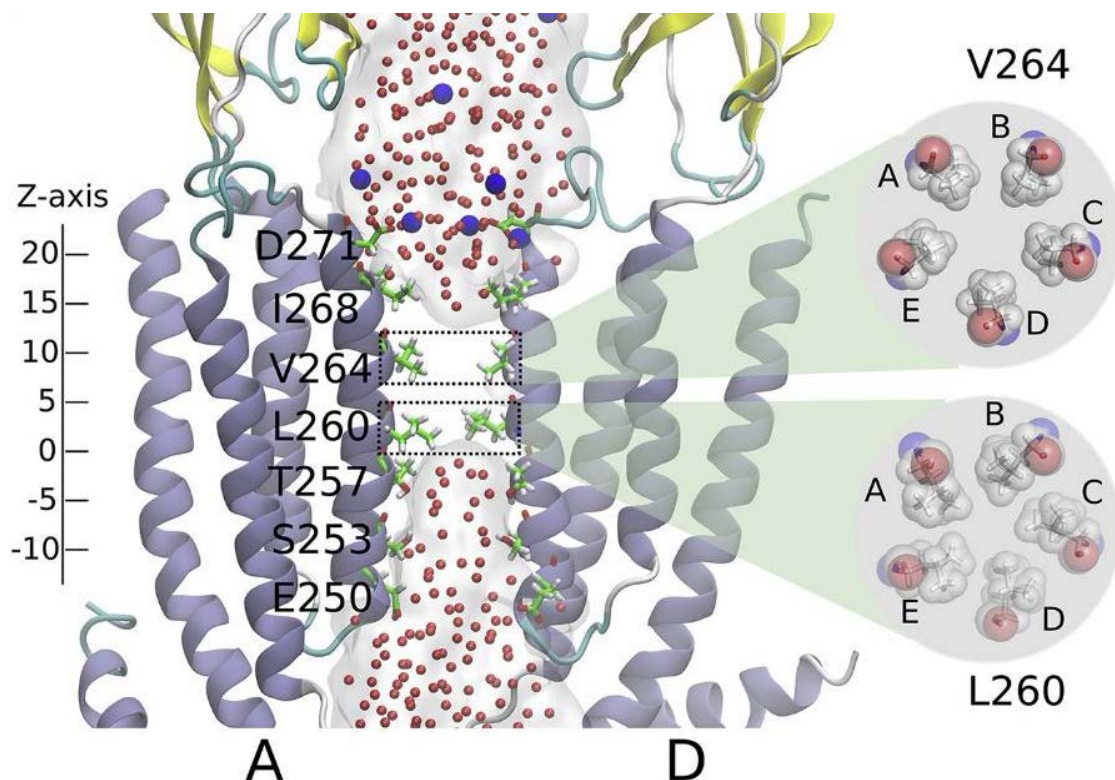


Figura 5. Compuerta hidrofóbica del receptor 5-HT₃. Sección transversal perpendicular al plano de la membrana a través de las subunidades A y D del receptor 5-HT₃ (panel izquierdo) en la estructura cristalina en ausencia de serotonina revela una puerta hidrófoba cerrada formada por los residuos L260 y V264 (secciones transversales en los planos L260 y V264, panel derecho) impidiendo la entrada de moléculas de agua. Se indican los residuos de aminoácidos de las hélices M2 a lo largo del canal. Imagen tomada de (Yuan et al., 2016).

La interfaz entre los dominios extracelulares y los dominios transmembrana es importante y recibe la denominación de “región de acoplamiento” porque acopla los cambios estructurales que tienen lugar en el ECD como consecuencia de la unión del ligando con los cambios estructurales que se dan en el poro iónico para posibilitar su apertura, y, por ende, la activación del canal. Estos incluyen el bucle β 1- β 2, el bucle β 6- β 7 (también conocido como *Cys-loop*), el bucle β 8- β 9 y la región entre β 10 y el TMD (Basak et al., 2018; Bouzat et al., 2004, 2008a; Gibbs y Chakrapani, 2021a; Hassaine et al., 2014; Thompson et al., 2010; Yuan et al., 2016).

Dominio Intracelular

Este dominio se une al citoesqueleto y está compuesto por *loops* intracelulares entre las hélices M1 y M2 y entre las hélices M3 y M4. El *loop* M1-M2 es relativamente corto, el *loop* M3-M4 posee una longitud de 70 a 120 aminoácidos (115 aminoácidos en el receptor 5-HT₃A), tiene la mayor heterogeneidad entre los pLGIC, e incluye una gran extensión de residuos estructuralmente desordenados. En los pLGICs que conducen cationes el ICD consiste en un *loop* corto (L1) que conecta M3 con un segmento helicoidal corto (MX), y un *loop* largo (L2) que conduce a una hélice anfipática asociada a la membrana (MA) seguida de M4. Este dominio tiene un papel importante en el tráfico de membrana, regulando la conductancia y activación del canal y las interacciones con otras proteínas de señalización. En el 5-HT₃ este dominio es un determinante principal de la conductancia del canal (Basak et al., 2018; Gibbs y Chakrapani, 2021a; Hassaine et al., 2014; Thompson et al., 2010; Yuan et al., 2016). La

estructura de 5-HT₃ muestra que las hélices MA se enrollan y forman una pirámide invertida que obstruye el paso de los iones intracelulares a lo largo del eje del poro, pero los iones pueden atravesar el poro mediante portales intracelulares que recubren la hélice MA. Una prueba clave de la permeabilidad de iones a través de portales intracelulares es la conductancia notablemente baja de canal único (0,4 pS) de 5-HT₃A en relación con otros pLGICs o el 5-HT₃A/B (16 pS). Se encontró que tres argininas dentro de la hélice MA (R416, R420 y R424) son las responsables de la baja conductancia de 5-HT₃A (Kelley et al., 2003). La mutación de estos residuos por los residuos glutamina, ácido aspártico y alanina presentes en 5-HT₃B, que son residuos polares y/o cargados negativamente (R416Q, R420D y R424A), permitió obtener subunidades tipo A de alta conductancia o HC (*High Conductance*) cuyas corrientes pueden ser detectadas a nivel de canal único (Brown et al., 2006; Corradi y Bouzat, 2014; Gibbs y Chakrapani, 2021b) (Figura 6).

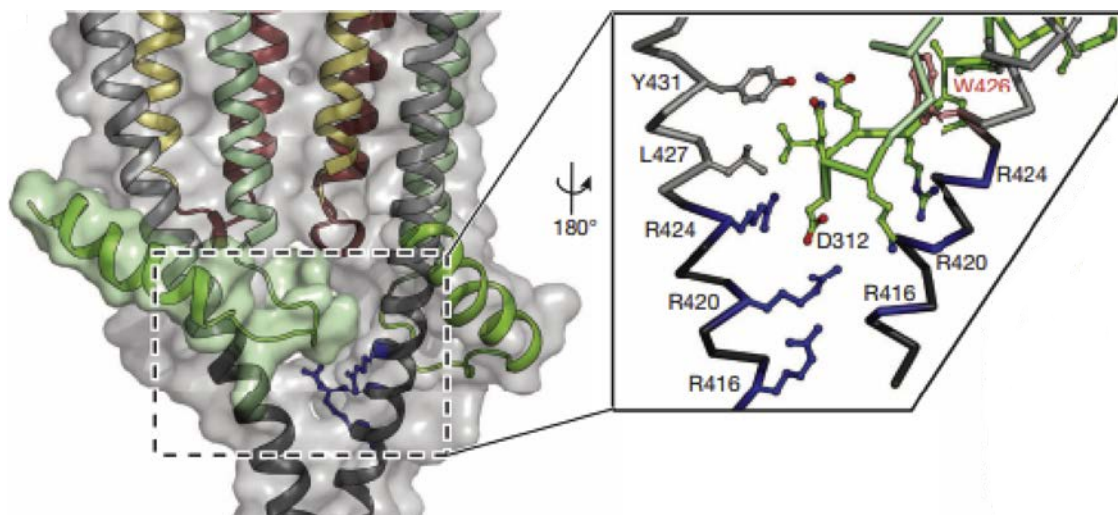


Figura 6. Dominio Intracelular del receptor 5-HT₃A. Vista lateral de dos subunidades, a nivel de dominio transmembrana e intracelular. El loop posterior a M3 y la hélice MX de una subunidad se resaltan con una superficie verde para mostrar cómo obstruye el portal entre las hélices MA. Los tres residuos de arginina que definen la conductancia se representan como palos azules. Recuadro: vista ampliada del vestíbulo intracelular que muestra dos interacciones MA-M4 (gris) y un bucle posterior a M3 (verde). Puntos rojos, átomos de oxígeno; puntos azules, átomos de nitrógeno. Imagen tomada de (Hassaine et al., 2014).

Cambios conformacionales y respuesta de los receptores

Cys-loop

La unión del ligando al sitio de unión produce un rápido cambio conformacional del receptor que conduce a la apertura del canal, este proceso se conoce como *gating* o gatillado. Sobre la base del modelo alostérico Monod-Wyman-Changeux (“MWC” (Monod et al., 1965), extendido a estos receptores, esta respuesta funcional del receptor se interpretó como una selección entre unos pocos estados conformacionales globales y discretos provocados por la unión del agonista. Es decir, los canales existen espontáneamente en equilibrio reversible entre estados cerrados y abiertos, que son estabilizados por agonistas. La unión del agonista al receptor provoca movimientos en el ECD que se traducen finalmente en un movimiento de los segmentos M2 que llevan al receptor al estado abierto: las hélices α que conforman este segmento transmembrana rotan y se inclinan aumentando el diámetro del poro del canal permitiendo, de ese modo, el flujo de iones a través del mismo. A nivel funcional, el ciclo de activación de los pLGICs implica transiciones entre al menos tres estados conformacionales distintos: el estado cerrado o de reposo, una conformación donde el receptor no conduce iones y posee baja afinidad por el agonista; el estado abierto, una conformación donde el receptor conduce iones y tiene alta afinidad por el agonista; y el estado desensibilizado, donde el receptor tiene una conformación no conductora, con alta afinidad por el agonista (Bouzat y Sine, 2018)(Figura 7). En ausencia de agonista, el canal predominantemente se encuentra en la conformación de reposo o cerrada; mientras que, en presencia del agonista, el canal se abre transitoriamente y pasa eventualmente a la conformación desensibilizada. Existen además subestados conformacionales cerrados, abiertos y desensibilizados, y las constantes de velocidad de las transiciones entre las distintas conformaciones varían según la naturaleza del receptor y el agonista (Basak et al., 2018; Changeux y Christopoulos, 2016).

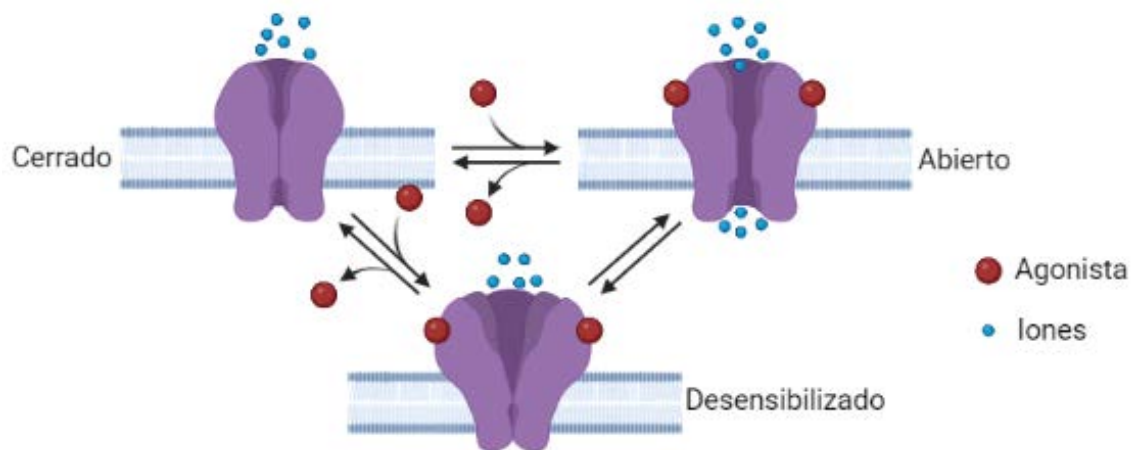


Figura 7. Esquema básico de los estados conformacionales de los receptores Cys-loop.

En la conformación de estado cerrado o de reposo se observa una constricción a nivel de los anillos hidrofóbicos del segmento M2 que determinan la compuerta de activación del canal (Nemecz et al., 2016). Se han identificado estados intermedios, en el que existen cambios conformacionales limitados al ECD sin que se transmitan al poro iónico, por lo que el canal permanece en estado cerrado, estos estados conformacionales son denominados estados pre-activos. Cuando el ligando se une al receptor, éste pasa del estado cerrado a un estado pre-activo, en el cual se observa una posición intermedia de la hélice M2 donde el punto de mayor constricción se encuentra en el residuo E-1', sugiriendo que este estado es mayormente impermeable. Los residuos por encima de L9' forman una barrera hidrofóbica (que requiere de la hidratación de los iones para atravesarla). Cuando se une el ligando, las hélices M2 se abren hacia afuera y giran, de esta manera se abre la compuerta del canal, pasando al estado abierto (Gibbs y Chakrapani, 2021a).

El gatillado del canal se produce mediante una serie de cambios conformacionales que se inician en el sitio de unión ortostérico, se propagan a la interfaz ECD-TMD o región de acoplamiento y a nivel de TM se reordenan los segmentos hasta abrir el poro iónico. Esta reorganización del receptor está mediada por dos transiciones alostéricas cuaternarias sucesivas: inicialmente tiene lugar una contracción radial del ECD denominada “(un)-blooming”, por la semejanza a un proceso inverso al

floreCIMIENTO, y posteriormente se produce el desenrollamiento o “*twisting*”, que consiste en la rotación concertada en sentido opuesto del ECD con respecto al TMD sobre el eje de simetría del receptor. Esta rotación expone más cargas negativas en el vestíbulo, cerca de la entrada al poro, y allí el *loop* móvil β 1- β 2, junto con el *loop* β 6- β 7 y el *loop* M2-M3 forman un bolsillo fuertemente negativo. Los receptores aniónicos tienen carga neutra en esta interfaz. Dentro del poro de la membrana, la hélice M2 sufre cambios significativos entre los distintos estados conformacionales antes mencionados (Cecchini y Changeux, 2015; Gibbs y Chakrapani, 2021a; Sauguet et al., 2014).

Las fuerzas de estabilización del agonista en el sitio de unión incluyen interacciones catión- π , interacciones catión-dipolo, puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals (Bartos et al., 2009; Celie et al., 2004; Xiu et al., 2009). Diferentes residuos aromáticos (triptófano, fenilalanina, tirosina) realizan una interacción catión- π en diferentes receptores *Cys-loop*. Estos residuos aromáticos se ubican en los tres *loops* de la cara principal. En el 5-HT₃, el residuo aromático triptófano del *loop* B (W156) forma la interacción catión- π con la 5-HT (Beene et al., 2002, 2004), mientras que en el receptor MOD-1 de *C. elegans* (también activado por 5-HT) es un W en el *loop* C (W226; (Mu et al., 2003)). Por lo tanto, incluso en receptores activados por el mismo ligando, el residuo involucrado en la principal interacción catión- π puede diferir (Thompson et al., 2010).

La comunicación a través de los 50 Å de separación entre el sitio de unión agonista hasta la compuerta que controla el flujo de iones dentro de la membrana celular, es fundamental para el correcto funcionamiento de los receptores *Cys-loop*. Hay tres estructuras del receptor fundamentales que transmiten la unión del agonista a la apertura del canal: el *loop* C, residuos de la interfaz de subunidades, y una serie de *loops* en la unión de los dominios extracelular y transmembrana. La interfaz entre el dominio extracelular y transmembrana es una zona de transición estructural en la que las hojas β del dominio de unión se fusionan con las hélices α del poro. Dentro de esta región, varios *loops* forman una red que transmite los cambios estructurales desde el sitio de unión hacia el poro. Al sustituir *loops* dentro de la interfaz que divide los ECD y TMD se encontró que la interfaz gobierna el tiempo que el canal permanece abierto y la

velocidad de desensibilización, de esta forma esta región controla el comienzo y la duración de la respuesta sináptica (Bouzat et al., 2008b).

El importante papel de los *loops* de la interfaz ECD-TMD, $\beta 1\beta 2$, Cys, $\beta 8\beta 9$, el final de $\beta 10$, la región pre-M1, el *loop* M2-M3 y post-M4, en el acoplamiento de la unión del agonista a la activación del canal se ha demostrado en numerosos estudios para todos los miembros de la superfamilia *Cys-loop*. El *bucle* $\beta 1\beta 2$ es esencial para la activación. Este bucle posee carga negativa en general. El *Cys-loop*, que es la firma de la familia, se inserta entre la región pre-M1 (cerca de su mitad C-terminal) y el dominio M2-M3 (cerca de su mitad N-terminal). El papel del *loop* $\beta 8\beta 9$ se comprende menos, pero la evidencia computacional y experimental confirma que está involucrado en la activación del canal. Este *loop* es largo y relativamente desestructurado, y es la región de mayor variación de secuencia entre los miembros de la familia. La región pre-M1, que conecta $\beta 10$ con M1, contiene varios residuos catiónicos, incluidas las argininas que se conservan en varios receptores *Cys-loop*. Se ha demostrado que uno de los residuos de arginina, Arg209, que está presente en todos los miembros de la familia, tiene un papel fundamental en la activación del nAChR del músculo. El residuo de arginina adyacente en los receptores 5-HT₃ (Arg222) también se ha implicado en la activación del canal (Bartos et al., 2009). El *loop* M2-M3 es otra de las estructuras clave que contribuyen a la apertura del poro, generando una redistribución de las cadenas laterales de varios residuos del TMD (Bouzat et al., 2004; J. Zhang et al., 2013).

En el sitio de unión del agonista, el *loop* C muestra el mayor movimiento tras la unión del agonista y parece cerrarse sobre el agonista (Celie et al., 2004; Gao et al., 2005). Este *loop*, entre las cadenas $\beta 9$ y $\beta 10$, es continuo con el dominio M1 a través de la cadena $\beta 10$. Por lo tanto, se espera que un cambio conformacional en el *loop* C se propague a lo largo de la cadena $\beta 10$ a M1, que se sabe que contribuye a la compuerta de canal. Se ha postulado que el pasaje del *loop* C de un estado abierto al cerrado luego de unirse el agonista se asocia con la activación del receptor (Bouzat et al., 2018; Mukhtasimova et al., 2009). Mientras que en presencia de agonistas completos el *loop* C adopta una configuración cerrada sobre la molécula de agonista unida, en presencia de agonistas parciales la configuración es semi-abierta. Los antagonistas, por el contrario, mantienen el *loop* abierto (Hibbs et al., 2009).

Además de su activación provocada por el agonista, la mayoría de los pLGICs muestran otra propiedad alostérica clave, a saber, la desensibilización, que consiste en un estado cerrado refractario a la activación tras la unión sostenida del agonista. Los datos estructurales y funcionales recientes sugieren que las compuertas de activación y desensibilización son distintas y están ubicadas a ambos lados del canal iónico.

Una vez que la puerta del canal está abierta, los iones fluyen según su gradiente electroquímico, la selectividad y conductancia del canal. El principal determinante de la selectividad iónica, es decir, el filtro de selectividad, se encuentra en el extremo citoplasmático del poro, en el nivel -1' de M2 para la mayoría de los pLGICs catiónicos y en el nivel -2' M2 para los aniónicos. Además, los residuos cargados en el dominio intracelular, ubicados en el segmento MA corriente arriba del extremo N-terminal de M4, recubren una supuesta salida lateral que sirve como un portal iónico intracelular antes mencionada (Hassaine et al., 2014). Por lo tanto, su carga influye en el paso de iones permeables, un mecanismo que explica las propiedades conductoras diferenciales entre los receptores 5-HT_{3A} y 5-HT_{3B} (Kelley et al., 2003).

Cabe destacar que la cinética de desensibilización de los pLGICs suele ser muy variable. La exposición prolongada de agonista, lleva al receptor a un estado desensibilizado, en el cual se han identificado reorganizaciones estructurales que derivan de movimientos del extremo superior de las hélices del TMD expandiendo el poro en ese nivel, y generando constricción en el extremo intracelular cerrando la compuerta de desensibilización, manteniendo abierta la compuerta de activación, mientras que la conformación del ECD no se modifica, conservando la elevada afinidad por el agonista (Bouzat et al., 2008b; J. Zhang et al., 2013).

Con respecto a la recuperación de la desensibilización después de la eliminación del agonista, la vía principal involucra primero la disociación del agonista del receptor desensibilizado y luego el receptor desensibilizado no unido experimenta una isomerización limitante de la velocidad hacia el estado de reposo (Gielen et al., 2018).

Receptores de serotonina humano y de *Caenorhabditis elegans* como blancos farmacológicos

En vertebrados, los receptores de serotonina están divididos en siete clases distintas (5-HT₁ a 5-HT₇) dependiendo de sus características estructurales y operativas (Hoyer et al., 2002).

A excepción del único pLGIC que participa en la neurotransmisión rápida, que es el canal iónico activado por serotonina, el receptor 5-HT₃ (Lummiss, 2012), la mayoría de los receptores de serotonina son receptores heptahelicoidales acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G-protein coupled receptors*), que actúan mediante procesos metabotrópicos relativamente lentos (Gibbs y Chakrapani, 2021b).

C. elegans posee una amplia variedad de receptores de serotonina, incluidos los receptores acoplados a proteína G (SER-1, SER-4, SER-5 y SER-7). Los análisis farmacológicos revelaron que estos receptores median una respuesta relativamente lenta a la 5-HT. Además, *C. elegans* posee pLGIC activados por 5-HT. Entre ellos, un receptor *Cys-loop* llamado MOD-1, que es un canal de cloruro que media respuestas hiperpolarizantes rápidas en neuronas y músculos (Hamdan et al., 2001; Hapiak et al., 2009; Hobson et al., 2003; Olde y McCombie, 1997; Ranganathan et al., 2000; Tsalik et al., 2003). Recientemente se identificó un canal de cationes controlado por 5-HT, LGC-50, pero no muestra superposición en la expresión neuronal con MOD-1, lo que sugiere que tienen funciones distintas y separadas en la comunicación serotoninérgica (Morud et al., 2021).

A continuación, se detallan los receptores de serotonina en *C. elegans* y en humano estudiados en esta Tesis, el receptor MOD-1 de *C. elegans*, y el receptor 5-HT_{3A} humano, como promisorios blancos farmacológicos (Figura 8).

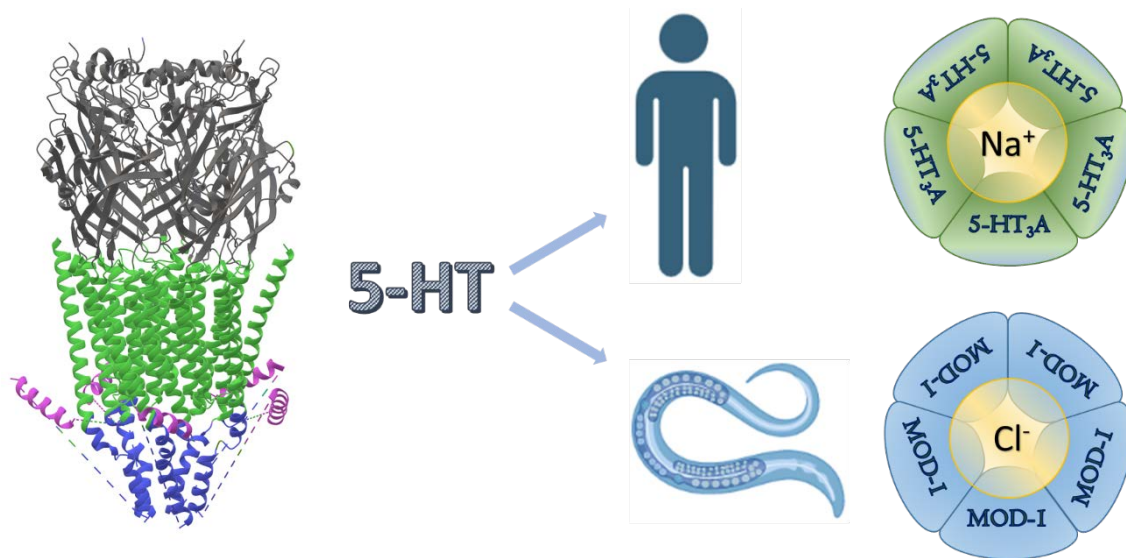


Figura 8. Canales iónicos activados por serotonina de humano y de *C. elegans*. $5\text{-HT}_3\text{A}$ es excitatorio, permeable a cationes como Na^+ ; mientras que MOD-1 es inhibitorio, permea iones Cl^- .

Este trabajo de Tesis se centró en el receptor MOD-1, que por su alta conservación dentro del filo Nematoda, se convierte en un blanco antihelmíntico prometedor debido a su ventaja de estar restringido a nematodos. Actuando sobre este receptor, compuestos con actividad agonista o moduladores positivos o negativos podrían ejercer un efecto antiparasitario. Por otro lado, se estudió el receptor $5\text{-HT}_3\text{A}$ humano, para el cual los fármacos específicos actuales utilizados principalmente como antieméticos, son los setrones, que son antagonistas competitivos. El hallazgo de moduladores alostéricos negativos sería de gran relevancia médica como antieméticos y para patologías del sistema nervioso que involucran a este receptor. El potencial terapéutico de los ligandos alostéricos deriva de su capacidad para modular la función del receptor sin modificar el patrón de activación endógeno, permitiendo su funcionamiento fisiológico. Este mecanismo conduce a un mejor perfil de seguridad en comparación con los ligandos ortostéricos (Al Kury et al., 2018).

Receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃) humano: expresión y rol fisiológico

El receptor 5-HT₃ es un canal selectivo a cationes activado por el ligando serotonina que pertenece a la familia de receptores *Cys-loop*, que media la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso central y periférico. Al igual que los demás miembros de esta familia, 5-HT₃ está comprendido por cinco subunidades dispuestas alrededor de un poro central conductor de iones, en este caso permeable a los cationes monovalentes Na⁺, K⁺ y menos a Ca²⁺.

El 5-HT_{3A} se expresa en el SNC, pero además se encuentra en grandes cantidades en el SNP y en el intestino (MacHu, 2011). Participa de manera prominente en la señalización del SNC y del sistema gastrointestinal (SNC-GI), debido a que más del 90% de la 5-HT se encuentra en el intestino. Específicamente, los receptores 5-HT₃ se encuentran en varias estructuras cerebrales como el tronco encefálico, en el núcleo del tracto solitario (NTS) y el área postrema. El receptor también está presente en el núcleo motor dorsal del vago (DMV), lo que implica la actividad del 5-HT₃ en respuestas fisiológicas como vómitos y regulación de la presión arterial. En humano, los 5-HT₃ también se detectan en niveles relativamente altos en el hipocampo y los ganglios basales y en niveles menores en la corteza. En estas regiones, hay sinapsis serotoninérgicas con receptores 5-HT₃ postsinápticos, pero también se encuentran 5-HT₃R presinápticos que modulan sinapsis GABAérgicas y dopaminérgicas (Eom et al., 2021; Gibbs y Chakrapani, 2021b).

Los receptores 5-HT₃ se encuentran sobre-expresados en la mucosa intestinal de pacientes con síndrome de intestino irritable con predominio de diarrea (SII). En el tracto gastrointestinal los 5-HT₃ modulan respuestas fisiológicas como el vaciado gástrico, peristaltismo colónico y el tránsito intestinal, por lo tanto, los antagonistas de los receptores 5-HT₃ se utilizan para tratar el SII con predominio de diarrea, aunque también desempeñan un papel importante en el dolor y la inflamación viscerales (Guzel y Mirowska-Guzel, 2022; Irving et al., 2021; MacHu, 2011).

Los receptores 5-HT₃ postsinápticos modulan la transmisión sináptica excitatoria rápida cuando se activan, mientras que los receptores 5-HT₃ presinápticos modulan la liberación de neurotransmisores, lo que implica una modulación de la plasticidad sináptica del SN en eventos celulares involucrados en la construcción cortical. Es por esto que la disfunción de los receptores 5-HT_{3A} está implicada en diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos, como el trastorno bipolar, la ansiedad, la depresión y la esquizofrenia (Basak et al., 2019).

Además, los receptores 5-HT₃ se expresan en varias células del sistema inmune, en particular, la subunidad A del receptor ha sido reportada en monocitos, condrocitos, células T, células B, tejido sinovial, plaquetas, células dendríticas y está sobre-expresado en linfomas. También los receptores 5-HT₃ se expresan en las células epidérmicas basales y pueden ser blancos para el tratamiento de enfermedades crónicas de la piel y prurito. De hecho, los antagonistas de 5-HT₃ reducen la gravedad del picor de la piel inducido por serotonina (Irving et al., 2021).

Los receptores 5-HT₃ están ampliamente distribuidos en otros sistemas de órganos del cuerpo humano, encontrándose además en los sistemas respiratorio, renal, urogenital y cardiovascular (Irving et al., 2021; Niesler et al., 2003).

Estructura de 5-HT₃

Hasta la fecha se conocen 5 subunidades (A-E) del receptor 5-HT₃ (Davies et al., 1999a; Maricq et al., 1991; Niesler et al., 2003), la subunidad A y B son las más estudiadas. La subunidad A es la única que forma un receptor homomérico funcional en sistemas de expresión heteróloga, y se requiere para formar receptores heteroméricos funcionales expresados de forma heteróloga (Niesler et al., 2003).

Este receptor presenta un 20-30% de identidad de secuencia aminoacídica y una estructura secundaria y terciaria similar a la de otros miembros de la familia *Cys-loop* (Maricq et al., 1991). En los últimos años, se han publicado diversas estructuras moleculares del receptor 5-HT_{3A} en estado de reposo y unido a setrones (Basak et al.,

2018, 2020; Hassaine et al., 2014). Las estructuras presentan semejanzas con las de otros pLGICs, con el ECD formado por hojas β , las 4 hélices α de cada subunidad que forman el TMD, y una resolución parcial del ICD en el que se observan las regiones MX y MA (Basak et al., 2018). El receptor homomérico 5-HT₃A forma canales de muy baja conductancia (<1 pS), por lo que su estudio mediante registros de canal único resulta imposible. Como se mencionó anteriormente, cuando las subunidades A y B se expresan de manera conjunta, formando un heterómero, presentan mayor conductancia (9-17 pS), detectable en estudios de canal único (Hanna et al., 2000; Kelley et al., 2003). Mediante la construcción de subunidades quiméricas A-B, se demostró que al mutar simultáneamente tres argininas de la subunidad A por los residuos presentes en la subunidad B antes mencionados, se obtuvo un receptor homomérico de alta conductancia, el cual puede ser estudiado por la técnica de *patch-clamp* a nivel de canal único (Bouzat et al., 2004, 2008a; Kelley et al., 2003; Peters et al., 2005).

Farmacología del receptor 5-HT₃

Los agonistas del receptor de 5-HT₃ no son utilizados en la clínica por ser altamente emetogénicos y ansiogénicos. En cambio, los antagonistas de 5-HT₃, mayormente los setrones, como granisetron, alosetron, ondansetron y palanosetron, se utilizan para aliviar los síntomas gastrointestinales asociados a la quimioterapia, radioterapia y anestesia; y síndrome de intestino irritable (Spiller, 2011; Theriot et al., 2022). También se consideran como terapia promisoría para el tratamiento de otros desórdenes neurológicos como esquizofrenia, depresión, ansiedad, adicciones, disfunción cognitiva y desórdenes alimentarios. Se ha informado que otros compuestos actúan como moduladores alostéricos negativos del receptor 5-HT₃ al unirse a cavidades dentro de la región transmembrana, incluidos los alcaloides (Baptista-Hon et al., 2012), esteroides (Wetzel et al., 1998), cannabinoides (Oz, 2005) y terpenos (Al Kury et al., 2018; Jarvis et al., 2016). Además, se ha demostrado que varios compuestos actúan como moduladores alostéricos positivos, como el alcohol (Lovinger y Zhou, 1998), 5-hidroxiindol (Van Hooft et al., 1997) y 5-cloroindol (Newman et al., 2013). Debido a que,

por un lado, los sitios alostéricos son más diversos debido a una baja presión evolutiva para la conservación y, por otro lado, la respuesta alostérica sigue la actividad temporal ejercida por el neurotransmisor endógeno natural, los moduladores alostéricos emergen como herramientas prometedoras para las terapias (Al Kury et al., 2018; Rojas y Slusher, 2012).

La cavidad de unión para alcoholes y anestésicos volátiles está ubicada entre las hélices M3 y M1 en subunidades vecinas en la interfaz ECD-TMD. La unión en este sitio estabiliza el estado abierto del canal. A concentraciones más altas, estos compuestos se unen a un sitio distinto de baja afinidad y actúan como moduladores alostéricos negativos (NAMs) (Gibbs y Chakrapani, 2021b). Los efectos de los alcoholes y los cannabinoides son aplicables a muchos compuestos naturales que se encuentran en los tratamientos tradicionales para las náuseas y el dolor. Los terpenos y terpenoides pequeños tienen estructuras químicas similares a los alcoholes o anestésicos más grandes. De acuerdo con su tamaño, moléculas como mentol, boldina, citronelol y geraniol son NAMs con una variedad de potencias. Sin embargo, otras moléculas de tamaño similar, como el timol y el carvacrol, son moduladores alostéricos positivos (PAMs). Otros NAMs naturales incluyen jengibre y capsaicina. Estas moléculas incrustadas en lípidos podrían actuar a través de mecanismos similares a los cannabinoides (Walstab et al., 2014; Ziemba et al., 2015).

Esta información muestra cómo los fármacos con grandes similitudes estructurales pueden ejercer efectos divergentes sobre el mismo receptor, reforzando la idea de que las modificaciones estructurales sutiles pueden resultar en múltiples efectos farmacológicos diferentes (Gibbs y Chakrapani, 2021b).

Receptor MOD-1 de *C. elegans*: expresión y rol fisiológico

Se reportaron seis pares de neuronas que contienen 5-HT (NSM, ADF, HSN, RIH, AIM y VC4 / 5) (Duerr et al., 2001; Gürel et al., 2012; Jafari et al., 2011; Sawin et al., 2000) y forman sinapsis significativas con otros 20 tipos de neuronas y con las células

musculares involucradas en la puesta de huevos *vm2* (Gürel et al., 2012). Trabajos previos han demostrado que la 5-HT liberada de las neuronas NSM y ADF difunde extrasinápticamente a las neuronas RIH y AIM, que mediante el transportador de recaptación de 5-HT, MOD-5, acumulan 5-HT (Jafari et al., 2011). Las NSM, serían las principales neuronas que liberan serotonina para provocar la ralentización de la locomoción (Sawin et al., 2000). La señalización a través de MOD-1, potencialmente en las neuronas motoras GABAérgicas y/o los músculos de la pared del cuerpo, proporcionaría uno de los mecanismos para ralentizar la locomoción del gusano (Gürel et al., 2012).

La alteración de la señalización serotoninérgica, ya sea por administración de serotonina exógena o por mutaciones en las rutas metabólicas de este neurotransmisor, afecta diferentes comportamientos, tales como la inhibición de la locomoción y la defecación, la estimulación de la puesta de huevos, el bombeo faríngeo, la toma de decisiones y el aprendizaje aversivo (Chase, 2007; Churgin et al., 2017; Iwanir et al., 2016; Y. Zhang et al., 2005).

MOD-1 funciona como un receptor de 5-HT selectivo para cloruro (Gürel et al., 2012; Menard et al., 2005; Mu et al., 2003; Ranganathan et al., 2000). Además, junto con el receptor de 5-HT acoplado a proteína G, SER-1, está involucrado en el comportamiento de apareamiento de los machos, y media un efecto inhibitorio de la serotonina sobre la puesta de huevos (Carnell, 2005). A su vez, MOD-1 está involucrado en la regulación del comportamiento locomotor, quizás mediante la modulación de la señalización interneuronal, actuando en conjunto con el receptor de serotonina acoplado a proteína G, SER-4 (Gürel et al., 2012; Harris et al., 2009). En presencia de alimentos, juega un papel en el inicio y la extensión del comportamiento de residencia o *dwelling-state*, tal vez actuando en las neuronas AIY, RIF y ASI, en oposición a la señalización mediada por el neuropéptido PDF (Flavell et al., 2013). Desempeña un papel importante en el aprendizaje aversivo tras la exposición a patógenos como la cepa PA14 de *P. aeruginosa*. Se ha propuesto que en respuesta a la serotonina liberada por las neuronas ADF serotoninérgicas, a través de MOD-1, *C. elegans* evita los olores del patógeno y aumenta su atracción por los olores de bacterias no patógenas familiares (Y. Zhang et al., 2005).

MOD-1 se expresa en un subconjunto de músculos y neuronas de la cabeza y la cola, incluidas las neuronas del cordón nervioso ventral, RME y GABAérgicas (Gürel et al., 2012). También se demostró que se expresa en neuronas AIY, RME, RID, RIF, ASI, DD1-6 y PVN (Flavell et al., 2013) (Figura 9).

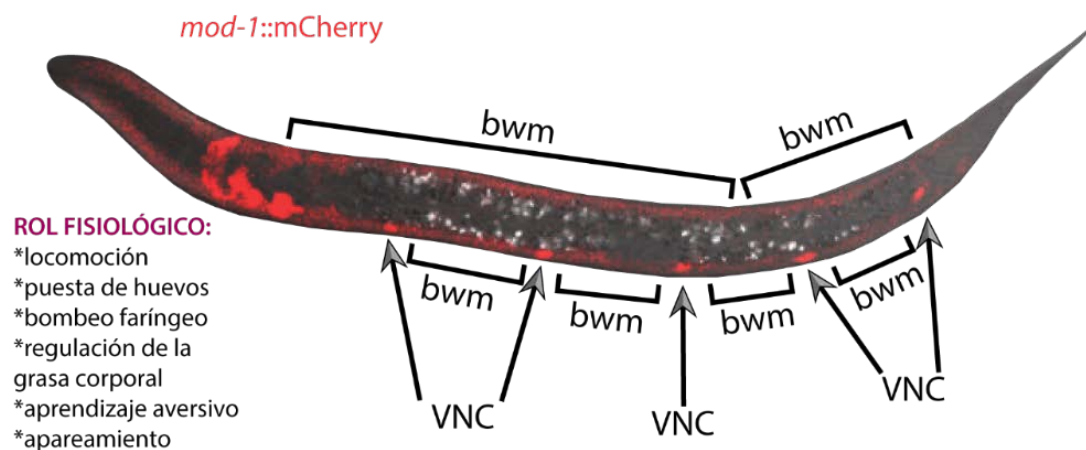


Figura 9: Rol fisiológico y expresión del receptor MOD-1 en *C. elegans*. Fluorescencia con *mod-1::mCherry* superpuesta a una imagen de campo claro de una larva L3. Las flechas apuntan a las neuronas del cordón nervioso ventral, VNC (del inglés: ventral cord neurons) y los corchetes indican los músculos de la pared corporal, bwm (del inglés: body-wall muscles). A la izquierda se resumen algunas funciones del rol fisiológico de MOD-1 en *C. elegans*. Imagen tomada y modificada de Gürel et al., 2012.

El receptor MOD-1 está restringido al filo Nematoda, es decir no se encuentra en los vertebrados. Como receptor *Cys-loop* aniónico, MOD-1 muestra aproximadamente un 30% de identidad con los receptores GABA y glicina. Los receptores 5-HT₃ y MOD-1 han evolucionado a partir de un gen ancestral común y responden a 5-HT, pero el primero es excitatorio y permea cationes, como ya se mencionó anteriormente y, el segundo es inhibitorio y permea cloruro.

Caenorhabditis elegans como organismo modelo

Sydney Brenner fue un biólogo británico-sudafricano, galardonado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 2002, conocido por sus trabajos en el campo de la biología molecular y la genética. Se lo considera una figura clave en el desarrollo de la biología moderna, especialmente durante la década de 1960. Además, propuso a *Caenorhabditis elegans* como modelo de primer nivel para estudiar el desarrollo embrionario. Utilizando este nematodo como modelo, Brenner pudo profundizar en los mecanismos de desarrollo involucrados en la formación de los organismos multicelulares. Por consiguiente, *C. elegans* es activamente estudiado en miles de laboratorios en todo el mundo (Brenner, 1974; Corsi et al., 2015; Hall, 2004).

Las ventajas de utilizar *C. elegans* como modelo de biología en eucariotas son: su tamaño pequeño, su gran cantidad de prole, su cultivo relativamente fácil, su mantenimiento de bajo costo, que se puede criar y preservar a largo plazo, su transparencia, su ciclo de vida rápido (~3 días a 20°C), que posee un número de células invariantes (Sulston et al., 1983), la habilidad para reducir la actividad génica alimentándolos con ARNi, y además, que son benignos, es decir no son patógenos ni alergénicos para el ser humano (Corsi et al., 2015).

C. elegans presenta características morfológicas y bioquímicas propias del filo Nematoda. Posee una organización del sistema nervioso semejante a la de especies parasíticas, y es sensible a la mayoría de las drogas utilizadas en quimioterapia antihelmíntica. Los receptores *Cys-loop* de nematodos tienen importancia clínica por ser blancos de fármacos antihelmínticos (Holden-Dye y Walker, 2014).

Los ensayos en organismos parasitarios presentan dificultades dadas por sus complejos ciclos de vida, la necesidad de hospedadores, entre otras. Es por ello que el nematodo de vida libre *C. elegans* emergió como modelo parásito para el descubrimiento de nuevos compuestos y blancos moleculares, así como para estudiar formas de resistencia en la terapia antihelmíntica. Existen diferencias moleculares entre las distintas especies dentro del filo Nematoda, pero *C. elegans* no es más diferente a los nematodos parásitos de lo que cada especie individual de parásito lo es de otra (Holden-Dye, 2007).

C. elegans es un modelo de interés en la industria farmacéutica para realizar ensayos *in vivo* rápidos y económicos, y en particular para la aplicación de métodos y tecnologías de alto rendimiento en ensayos de detección de compuestos con actividad biológica.

Filo Nematoda

Los nematodos (del griego nema, "hilo", eídés u oídos, "con aspecto de"), forman el cuarto filo más abundante y ubicuo del reino animal. De cada cinco animales del planeta, cuatro son nematodos. Este filo incluye alrededor de 25.000 especies descritas y se estima un número mayor sin clasificar. La mayoría de los nematodos son de vida libre, son beneficiosos para el ecosistema, pero muchas especies han adoptado un estilo de vida parasitaria. Se los encuentra en agua de mar, agua dulce y en el suelo, desde climas polares hasta tropicales. Además, se encuentran como parásitos de vertebrados, insectos, plantas, y de otros nematodos (Blaxter y Koutsovoulos, 2015).

Los nematodos de vida libre se alimentan de bacterias, algas, hongos y otras partículas microscópicas que encuentran en su entorno. Estos organismos también pueden desempeñar un papel importante en los ecosistemas, ya que ayudan a descomponer la materia orgánica y a mantener el equilibrio de los nutrientes.

Los nematodos parásitos infectan plantas y animales invertebrados y vertebrados. Más de 60 especies de nematodos parasitan a los humanos (Mathew et al., 2016). Las relaciones entre los nematodos y sus huéspedes varían desde la asociación necroménica (en la que el nematodo usa el huésped para transportarlo a nuevas fuentes de alimento y como fuente de alimento al morir), asociación forética (en la que el hospedador asociado solo es utilizado como medio de transporte), y hasta ciclos de vida complejos que involucran múltiples huéspedes intermedios (Kiontke y Sudhaus, 2006; Riddle et al., 1997).

Las razones del éxito de los Nematodos como parásitos probablemente incluyen la presencia de una cutícula protectora del medio ambiente, diapausa facultativa (como

la etapa *dauer* de *Caenorhabditis elegans*), adaptaciones bioquímicas a la existencia en condiciones extremas y el uso de una variedad de estrategias reproductivas (Riddle et al., 1997).

El Filo Nematoda pertenece a un clado mayor denominado *Ecdysozoa*, su crecimiento va acompañado de mudas de cutícula (ecdisis) (Corsi et al., 2015). Los nematodos se subdividen en dos clases, *Adenophorea* y *Secernentea*. A esta última clase pertenecen muchas formas parásitas y la mayoría de las especies de vida libre que habitan el suelo, entre ellas el Orden *Rhabditida* (Ruppert y Barnes, 1996). Blaxter y colaboradores los han clasificado, además, en cinco clados principales. *Caenorhabditis elegans* (miembro de la orden *Rhabditida*) se presenta en el clado V junto con el suborden *Strongylida*, que incluye una serie de nematodos patógenos de interés veterinario, como *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus spp*, o aquellos que afectan la salud humana, los géneros *Ancylostoma* y *Necator*. El clado III incluye ascárides y filariales; el clado IV incluye los nematodos parásitos de plantas *Globodera spp*, *Heterodera spp* y *Meloidogyne spp*; y el clado más distante de *C. elegans*, el clado I incluye *Trichinella spp*, *Trichuris spp* y *Xiphinema* (Sepúlveda-Crespo et al., 2020).

Características generales de *C. elegans*

C. elegans, como todos los nematodos, posee el cuerpo cilíndrico, carece de segmentos, es alargado y delgado y con sus extremos aguzados. Puede ser aislado de frutas o flores en descomposición del suelo de ambientes con clima templado. Es muy pequeño y se alimenta de bacterias. Las larvas recién eclosionadas miden aproximadamente 0,25 mm y los adultos pueden llegar a medir hasta 1 mm de largo. Está formado por un tubo externo, o pared corporal, que consiste en la cutícula, la hipodermis, el sistema excretor, las neuronas y los músculos; y un tubo interno que contiene la faringe, el intestino y las gónadas en los adultos; estos tubos están separados por un espacio pseudo celómico conteniendo un fluido presurizado en la cavidad que mantiene una presión hidrostática. Es transparente, lo cual permite observar con

claridad sus células individuales y además utilizar proteínas fluorescentes para marcar proteínas o compartimentos celulares que se deseen estudiar (Corsi et al., 2015) (Figura 10).

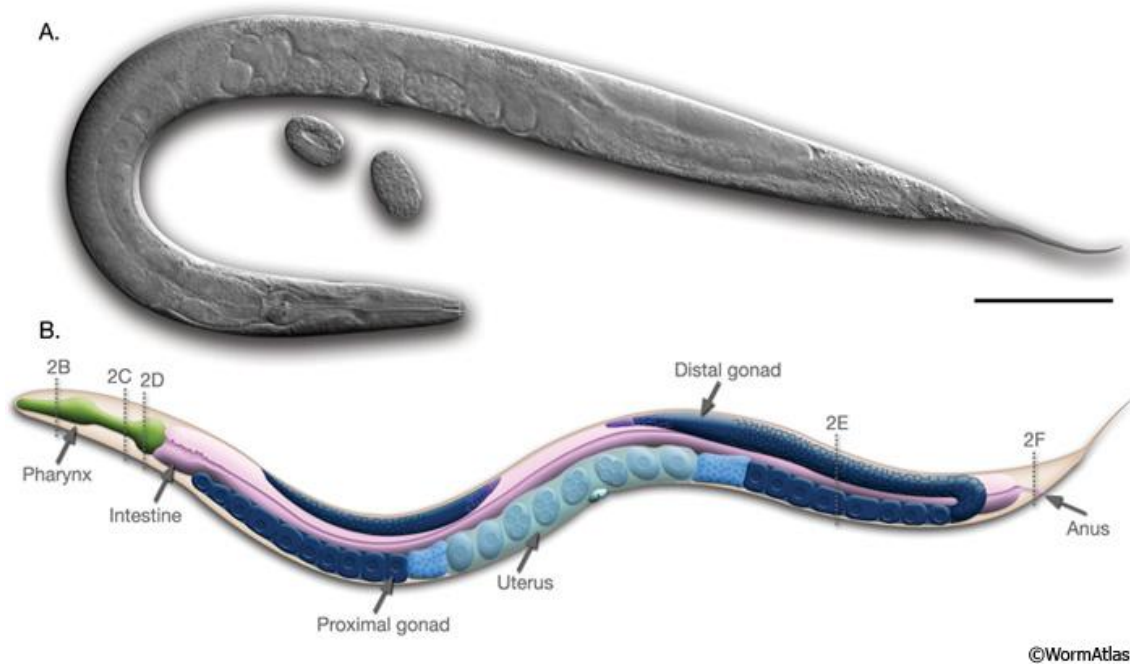


Figura 10. Anatomía de un adulto hermafrodita. A. Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC). Barra de escala 0,1 mm. B. Dibujo esquemático de estructuras anatómicas, lado lateral izquierdo. Imagen tomada de WormAtlas.

La capa epitelial más externa es un sincicio (células multinucleadas) que secreta la cutícula. La cutícula es una capa protectora de matriz extracelular compleja compuesta por colágeno, lípidos y glicoproteínas. La cutícula es el soporte de los nematodos, es la que determina la forma de su cuerpo (Corsi et al., 2015).

El sistema nervioso consta de 302 neuronas y 56 células gliales en hermafroditas, y de 383 en machos. De estas neuronas, 282 corresponden al sistema nervioso somático; y 20 neuronas conforman el sistema nervioso faringeal; comunicados ambos sistemas por una serie de interneuronas. La mayoría de los cuerpos neuronales se organizan en unos pocos ganglios ubicados en la cabeza, cordón ventral y en la cola (los machos

poseen la mayoría de sus neuronas adicionales en su cola especializada). La mayoría de las neuronas tienen una estructura simple con 1 o 2 neuritas y algunas células gliales, y se sitúan en la cabeza alrededor de la faringe, conteniendo numerosos receptores sensoriales, mayormente mecanosensoriales y quimiosensoriales. Desde la cabeza a la cola, se encuentra el cordón nervioso ventral que recorre todo el cuerpo del gusano de manera longitudinal, formado principalmente por motoneuronas y procesos axonales y dendríticos que regulan numerosos comportamientos relacionados con los sistemas motores. Por otro lado, posee un cordón nervioso dorsal, más simple que el ventral, ya que solo posee los procesos de las motoneuronas que inervan los músculos de la zona dorsal y algunas interneuronas (Corsi et al., 2015).

C. elegans posee muchos de los neurotransmisores más comunes, incluyendo acetilcolina, glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA), dopamina, y serotonina, y sus receptores (Hobert, 2013b).

Este nematodo, además, posee un número de células somáticas invariable, esto permitió rastrear el destino de cada célula y generar un linaje celular completo. Se conoce por completo el diagrama de cableado de su sistema nervioso, y fue, además, el primer genoma de un metazoo en ser completamente secuenciado. El genoma entero tiene un tamaño de 100 Mb (Consortium*, 1998) y, 20.444 genes que codifican para proteínas (Corsi et al., 2015).

Posee 95 células musculares, divididas en 16 en la cabeza, 16 en el cuello y 63 en el resto del cuerpo (Altun y Hall, 2009), que le permiten mediante la contracción y relajación realizar el típico movimiento sinusoidal “elegante” del gusano. Los músculos son estriados en forma oblicua y las células son mononucleadas (a diferencia de lo que ocurre en vertebrados). De manera inusual, en lugar de las neuronas dirigir sus axones hacia las células musculares, en *C. elegans* las células musculares de la pared del cuerpo poseen extensiones llamadas brazos musculares en las que se producen las sinapsis con las motoneuronas (Altun y Hall, 2009).

Por otra parte, presenta músculos que controlan la ingesta (músculos faríngeos), la puesta de huevos (músculos uterinos y de la vulva), el apareamiento (específicos de la cola del macho), y la defecación (músculos entéricos) (Corsi et al., 2015).

El sistema digestivo, consta del intestino, que está adherido a la parte posterior de la faringe y consiste de 20 células epiteliales poliploides organizados en pares que forman un tubo que recorre el animal en su eje antero-posterior. La comida ingresa por la parte anterior del gusano y pasa a través de la faringe, donde es triturada, para luego continuar al intestino para su digestión (Corsi et al., 2015).

El tejido reproductivo en ambos sexos posee diferencias, tanto en la gónada somática, en las estructuras sexuales secundarias y en el tamaño corporal. Las gónadas albergan la línea germinal donde se desarrollan los ovocitos y los espermatozoides. La gónada de las hermafroditas está constituida por dos brazos en forma de U simétricos y bilaterales que, a través de la espermateca, se conecta al útero, donde comienza el desarrollo de los huevos. La gónada de los machos posee un solo lóbulo en forma de U que se conecta con el exterior mediante el ano o cloaca.

Las estructuras secundarias de apareamiento sexual son la vulva en los hermafroditas y la cola en forma de abanico en los machos. La vulva se desarrolla en el centro de la epidermis en el lado ventral del hermafrodita y es el conducto para la entrada de los espermatozoides del macho y la puesta de óvulos desde el útero (Corsi et al., 2015).

Ambos sexos son diploides para los 5 cromosomas autosómicos. Los hermafroditas tienen ovotestis, que primero produce esperma ameboide haploide, que es almacenado en la espermateca en la etapa L4. Luego cerca de la adultez la línea germinal cambia para formar ovocitos mucho más grandes. Pueden producir una progenie de hasta 300 individuos por autofecundación. Si se aparean con machos, pueden producir una progenie de hasta 1000 individuos. La mayoría de los gusanos son hermafroditas autofecundantes, los machos existen con una muy baja frecuencia, <0,2 % (Corsi et al., 2015; Frézal y Félix, 2015).

Ciclo de vida de *C. elegans*

A 20°C una hermafrodita se autofecunda. Luego de la fertilización se forma la cáscara del huevo, que es impermeable. En estadio de gástrula pone los huevos (entre 24-30 células). El desarrollo embrionario ocurre fuera del útero, en 12 horas promedio se produce la eclosión, con 558 núcleos, y se produce la larva de la primera etapa larval (L1). En presencia de comida, los gusanos comienzan a comer y se desarrollan pasando por 4 etapas larvales (L1-L4). Cada etapa termina con un periodo de inactividad similar al sueño llamado letargo, en el que se forma una nueva cutícula (capa externa de colágeno); y el letargo termina con la muda de la cutícula vieja (Corsi et al., 2015).

La etapa L1 tiene una duración de ~16 horas, y luego avanza a L2 mudando en 12 horas aproximadamente, de L2 muda a L3 en 8 horas, la gónada se va haciendo prominente, de L3 pasa a L4 en 8 horas y la gónada ya está madura y se distingue por la vulva refringente (medialuna blanca). Pasa luego al estadio adulto joven, que se distingue por no tener la vulva refringente y sin presencia de huevos. Luego de 8 horas, pasa a adulto formador de huevos por un periodo de 2 a 3 días. Después del periodo reproductivo, los hermafroditas pueden vivir varias semanas más antes de morir de senectud (Corsi et al., 2015).

Si luego de eclosionar, no hay presencia de comida o estrés por hacinamiento, antes de llegar a la L2, la larva toma el camino alternativo de larva "*Dauer*" (del alemán, que significa duradero), en el cual la cutícula cubre su boca y ano, impidiendo que el gusano coma y deteniendo su desarrollo. La cutícula *dauer* tiene mayor resistencia y le proporciona al gusano una gran resistencia al daño por el ambiente. Las larvas *dauer* pueden sobrevivir en ese estadio muchos meses (más de 4 meses), hasta que sea propicio el ambiente en presencia de comida, muda a L4 directamente (Corsi et al., 2015).

Las larvas *dauer*, son parte de una etapa de desarrollo crucial para el estilo de vida, la resistencia al estrés, la dispersión a largas distancias y capacidad de hibernación de *C. elegans*. Las larvas *dauer* exhiben una locomoción activa, además de un comportamiento llamativo propio de esta etapa, que es la nictación (se paran sobre su cola y agitan el cuerpo en el aire), este comportamiento se puede dar en grupo y, se cree que ayuda a las larvas a encontrar huéspedes invertebrados para usarlos para su

dispersión, como pueden ser los isópodos, caracoles y babosas (Blaxter y Denver, 2012; Frézal y Félix, 2015) (Figura 11).

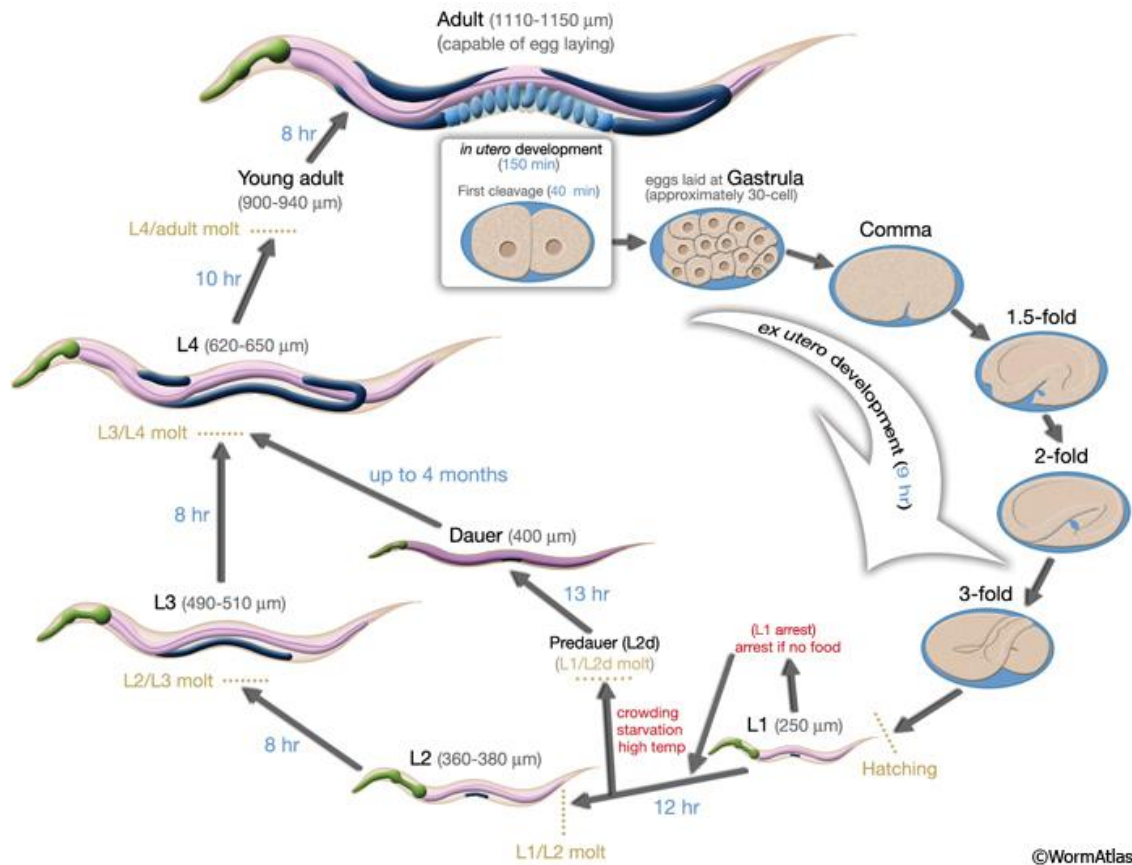


Figura 11. Ciclo de vida de *C. elegans* a 20°C. Los números en azul a lo largo de las flechas indican el tiempo que el animal pasa en una determinada etapa. La longitud del animal en cada etapa está marcada junto al nombre de la etapa en micrómetros (μm). 0 min es la fertilización. La primera escisión se produce aproximadamente 40 minutos después de la fecundación. La puesta de huevos ocurre aproximadamente 150 minutos después de la fertilización y durante la etapa de gástrula. Imagen tomada de WormAtlas.

Antihelmínticos: Búsqueda de nuevos blancos.

El uso de antihelmínticos es una herramienta fundamental para el control de la infestación por parásitos y para prevenir complicaciones graves, sin embargo, su

disponibilidad es limitada. Esto se debe a que muchos países en desarrollo, que son los más afectados por esta problemática, no tienen acceso a estos medicamentos debido a los altos costos de producción y distribución; y la ausencia de interés de la industria farmacéutica. Es esperable, por ello, la pérdida de potencia y la generación de resistencia a medida que el uso de estos limitados agentes disponibles sea más extensivo.

Los antihelmínticos son de suma importancia para la salud humana y para la medicina veterinaria. Las infecciones por parásitos afectan a millones de personas en el mundo, además de generar un impacto económico negativo en ganadería y en cultivos, y afectar a los animales domésticos, también susceptibles a las infecciones parasitarias. Cabe señalar que el mercado de los animales de compañía emprende programas de descubrimiento de fármacos. La mayoría de los medicamentos disponibles para el tratamiento de parasitosis en humanos se desarrollaron primero como medicamentos de uso veterinario (Holden-Dye y Walker, 2014).

Una de las principales barreras para el desarrollo de fármacos antihelmínticos es la falta de financiamiento para la investigación y el bajo potencial de mercado para los compuestos desarrollados. Sin embargo, el control de la transmisión constituye un pilar fundamental para disminuir la prevalencia de la enfermedad. Esto implica el uso de medidas de higiene y el control de los vectores y los animales reservorios, así como la educación de la población para reducir la exposición a los huevos y larvas de los helmintos. Por otro lado, prevenir la reinfección para controlar la propagación de helmintos resistentes implica mejorar la gestión de los residuos sólidos y la limpieza del agua y el suelo, así como el uso de medidas preventivas para evitar la exposición a los helmintos. Tal es así, que la disponibilidad futura de nuevos antiparasitarios no solo se encuentra comprometida por el progresivo aumento de resistencia sobre todo en el ganado, sino también por la falta de descubrimiento de nuevos productos. Además, el impacto ambiental negativo de los nematicidas utilizados para la protección de cultivos, ha llevado a dejar de usarlos y, por ende, hay mayor riesgo de plagas de nematodos en agro cultivos. Existe, por lo tanto, una urgente necesidad de esfuerzos concertados para esta área de investigación (Holden-Dye y Walker, 2014; Rana y Misra-Bhattacharya, 2013).

Muchos antihelmínticos usados actualmente utilizan como blanco de acción los pLGIC de nematodos, aunque no se conoce en detalle aspectos moleculares de estos receptores, tales como la estequiometría y los mecanismos moleculares de su activación y modulación. Estas drogas ejercen su acción terapéutica al actuar como agonistas completos de estos receptores, tal es el caso de piperazina sobre el receptor de GABA (Martin, 1985), o levamisol sobre el nAChR (S. J. Robertson y Martin, 1993). El conocimiento de estos receptores, su farmacología y propiedades de activación es de relevancia para el desarrollo racional de nuevos fármacos.

Los antihelmínticos y nematicidas se dividen, generalmente, en base a su estructura química y modo de acción similar:

- Piperazina

Utilizado desde la década de 1950 como antihelmíntico, principalmente en infecciones por oxiuros en niños. Produce una parálisis flácida y reversible en los parásitos, mediante su agonismo parcial débil de los canales de cloruro activados por GABA (Holden-Dye y Walker, 2014; Martin, 1985).

- Benzimidazoles: albendazol y tiabendazol

Producen alteración en la locomoción y la reproducción, además de un efecto perjudicial sobre los ovocitos, al comprometer el citoesqueleto de los parásitos debido a su interacción selectiva con la β -tubulina (Hahnel et al., 2020; Holden-Dye y Walker, 2014).

- Imidazotiazol: levamisol y tetrahidropirimidinas: pirantel y morantel

Estos fármacos actúan como agonistas de los nAChR y provocan parálisis espástica en los músculos de los parásitos debido a la activación prolongada de los receptores nicotínicos excitatorios musculares de la pared del cuerpo del nematodo (Hahnel et al., 2020; Holden-Dye y Walker, 2014).

- Espiroindoles: paraherquamida y derquantel

La paraherquamida y su derivado el derquantel (2-desoxi-paraherquamida) inducen parálisis flácida en los parásitos. Han demostrado actuar como antagonistas competitivos típicos de los nAChR (A. P. Robertson et al., 2002).

- Lactonas macrocíclicas; avermectinas y milbemicinas; ivermectina y moxidectina.

La ivermectina deriva de las avermectinas (lactonas macrocíclicas), que se generan como productos de la fermentación del microorganismo *Streptomyces avermitilis*. Provoca una potente y persistente parálisis de la faringe de los nematodos, y de la pared corporal. Su potente actividad antihelmíntica se debe, principalmente, a su acción como agonista alostérico del GluCl, un canal aniónico activado por glutamato de la familia de pLGIC, que al incrementar la permeabilidad a iones cloruro en las células genera hiperpolarización de la célula muscular o nerviosa y desencadena la parálisis y la muerte del parásito. Además, también actúa sobre los receptores de GABA de nematodos (Hahnel et al., 2020; Holden-Dye y Walker, 2014).

- Ciclooctadepsipéptidos: emodepside

Es un producto de fermentación obtenido del hongo *Mycelia sterilia* de *Camelia japónica*. Demostró ser eficaz en parásitos resistentes a levamisol, ivermectina y levamisol, lo cual exhibe un nuevo mecanismo de acción. Inhibe el bombeo faríngeo, la motilidad y la puesta de huevos al actuar en el sistema neuromuscular de los nematodos. Actúa a través de un canal de potasio activado por calcio, SLO-1, presente en *C. elegans*. Además, los estudios en *A. suum* han resaltado la parálisis muscular y apuntan a un mecanismo de acción dependiente del calcio y el potasio (Hahnel et al., 2020; Holden-Dye y Walker, 2014).

El sistema nervioso de los nematodos todavía posee receptores y canales iónicos sin explorar, como son los receptores de aminas, como MOD-1, que pueden ser nuevos blancos potenciales para generar la base de nuevos compuestos antihelmínticos (Wolstenholme, 2011).



**MATERIALES Y
MÉTODOS**

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *C. elegans*

Todas las cepas de nematodos utilizadas en este trabajo de Tesis, fueron adquiridas a través del *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC), que es financiado por los Institutos Nacionales de Salud y el Centro Nacional de Recursos de Investigación (*National Institutes of Health National - Center for Research Resources*, NIH NCRR).

Se utilizaron las siguientes cepas de *C. elegans*:

- **N2**, genotipo salvaje, Bristol *wild-type*.
- **PD4251**, genotipo *ccls4251 I;dpy-20(e1282) IV*, contiene *myo-3::GFP* y expresa GFP nuclear y mitocondrial de manera estable en todos los músculos de la pared del cuerpo y de la vulva.
- **MT9668**, genotipo *mod-1(ok103) V*, cepa mutante que carece del canal iónico de cloruro activado por serotonina.
- **NC782**, genotipo *unc-119 (ed3) III; wdEx290*, expresa GFP en las neuronas de la cabeza, de la cola y VNC.

Cultivo y mantenimiento de *C. elegans*:

La metodología y estrategias de manipulación de *C. elegans* se realizaron de acuerdo con los protocolos disponibles en *Wormbook* (Stiernagle, 2006), y su gran mayoría ya estaban implementadas en el laboratorio (Hernando et al., 2012; Hernando y Bouzat, 2014; Jones et al., 2011; Rayes et al., 2007).

Se cultivaron las cepas sobre placas de Petri conteniendo un medio para crecimiento de nematodos (*Nematode Growth Medium*, NGM) con bacterias *Escherichia coli* cepa OP50 (auxótrofa para uracilo, con lo cual el crecimiento es limitado sobre las placas de NGM), crecidas en medio LB (del inglés "*Lysogeny broth*"), como fuente de alimento (Brenner, 1974), en un rango de temperatura de 12 a 25 °C, dependiendo de la velocidad de desarrollo para cada experimento que es condicionada por la temperatura. *C. elegans* crece más rápido a temperaturas más altas.

Para obtener poblaciones mayores de nematodos, se utilizaron placas con medio de cultivo 8P (enriquecido con peptona) sembradas con bacterias *E. coli* Na22, que forman un césped muy abundante de alimento.

Para preparar las placas de NGM ("*Nematode Growth Media*") agar se utilizaron: 3 g de NaCl, 17 g de agar y 2,5 g de peptona de caseína disueltos en agua necesaria para 1 litro, luego se autoclavaron y se les agregó 1 ml de CaCl₂ (1M), 1 ml de colesterol en etanol (5 mg/ml), 1 ml de MgSO₄ (1M) y 25 ml de *buffer* KPO₄ (1M, pH 6,0).

Para preparar las placas de 8P se utilizaron: 3 g de NaCl, 20 g de peptona de caseína, 25 g de agar para 1 litro de agua, se autoclavaron y se enriquecieron las placas con 1 ml de MgCl₂ (1M), 1 ml de colesterol en etanol (5 mg/ml), 1 ml de MgSO₄ (1M) y 25 ml de *buffer* KPO₄ (1M, pH 6.0).

Los cultivos de bacterias *E. coli* cepas OP50 y Na22 se siembran en placas de Petri de LB agar (10 g de triptona, 5 g de levadura, 5 g de NaCl, 15 g de agar y 1 litro de agua, pH 7,5 esterilizado por autoclave), luego se dejan a 37 °C por 24 horas, se pica una colonia con un ansa y se deja crecer a 37 °C con agitación durante 8 horas en LB (10 g de triptona, 5 g de levadura, 5 g de NaCl en 1 litro de agua, pH 7 esterilizado por autoclave) en el caso de la cepa OP50, o en 2xYT (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl en 1 litro de agua, pH 7 y autoclavado) en el caso de la cepa Na22. La suspensión de las cepas de *E. coli* debe ser guardada a 4°C y se puede utilizar por varios meses. Se siembran las placas con dichas suspensiones de bacterias, se dejan secar y se almacenan a 4 °C listas para ser utilizadas.

Congelamiento y descongelamiento de gusanos

Las cepas de *C. elegans* resisten a ser congeladas y pueden mantenerse por largo tiempo en nitrógeno líquido (-196 °C) o en un *freezer* a -80 °C (Brenner, 1974). Debido a la existencia de un estadio de resistencia llamado “*dauer*” (del alemán, resistente), las cepas de nematodos pueden ser recuperadas luego del ser congeladas. El estadio *dauer* se puede dar por distintas condiciones de estrés del gusano en etapa larval L1, ya sea por, alta densidad de población en la placa, poca disponibilidad de alimento, o una temperatura desfavorable, mayor a 25 °C.

Para proceder a congelar las cepas y poder así, disponer de un *stock* de reserva de nematodos en el laboratorio, se utilizaron gusanos que se encontraban en el estadio larval L1-L2, con poca disponibilidad de alimento en las placas de agar y con huevos como indicador de que no hubo hambruna y, además, libre de contaminación. Dichos nematodos fueron lavados con *buffer* M9 y transferidos a tubos Falcon de 15 ml, se centrifugaron por 3 min a 1200 rpm, descartando el sobrenadante y se les agregó *buffer* M9 y una solución de congelamiento (*freezing solution*), luego se transfirieron a crioviales para ser congelados a -80 °C.

El *buffer* M9 se preparó con 3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 5 g de NaCl, 1 ml de MgSO_4 (1 M), y agua para completar 1 litro, que luego se esterilizó por autoclave.

La solución de congelamiento se preparó con 5,8 g de NaCl, 50 ml de KH_2PO_4 (1 M) a pH 6, 240 ml de glicerol y 710 ml de agua, se esterilizó por autoclave y luego se agregó 30 μL de MgSO_4 (1 M) cada 100 ml de solución.

Para proceder a descongelar y recuperar las cepas cuando fue necesario, se retiraron del *freezer* a -80 °C los crioviales y dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos, luego se sembraron los gusanos en placas nuevas de NGM con bacterias, y al cabo de 1 hora se observaron las placas para confirmar la sobrevivencia de los gusanos.

Transferencia de gusanos en placas

Las cepas crecidas en placas con agar NGM fueron mantenidas y ampliadas mediante el uso de dos técnicas de transferencia que se realizan a temperatura ambiente. Una de ellas es, la denominada “*chunking*”, que consiste en cortar una sección de agar conteniendo los gusanos con un bisturí y colocarlo en una placa nueva con bacterias. Los gusanos se moverán desde el corte de agar hacia las bacterias distribuyéndose en la nueva placa para continuar con su desarrollo. Esta técnica permite mantener viable una cepa. La otra técnica, que se utiliza para ampliar las poblaciones de gusanos, sincronizarlos o decontaminarlos, consiste en levantar con agua milli-Q los gusanos, pasarlos a un tubo tipo Falcon de 15 ml, centrifugar por 3 min a 1200 rpm, para luego sembrar el sedimento de gusanos en una placa nueva con césped bacteriano.

Sincronización de cultivos

Para obtener nematodos en un mismo estadio de desarrollo, se realizó la sincronización del cultivo de la cepa. Los nematodos hermafroditas adultos grávidos se recolectaron de las placas NGM con agua destilada, se colocaron en un tubo tipo Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 1200 rpm para eliminar restos de bacterias. Se realizaron varios lavados retirando el sobrenadante del tubo luego de las centrifugaciones y se resuspendió el *pellet* de nematodos con agua destilada limpia, hasta que no se observaron restos bacterianos. Luego al *pellet* de gusanos se lo incubó con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 1 % e hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M por un lapso de 5 minutos. Al cabo de este período de tiempo, se detuvo la reacción con agua destilada, y se centrifugó a 1200 rpm por 3 minutos, se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados sucesivos. De esta manera, se obtuvieron huevos, que no fueron afectados por el tratamiento, y se sembraron en placas de Petri conteniendo solo NGM. Se dejaron eclosionar los huevos hasta el día siguiente, y luego las larvas L1 fueron colocadas en

placas de Petri NGM sembradas con OP50, para continuar su desarrollo y crecimiento de manera conjunta y sincronizada hasta el estadio necesario para realizar los ensayos posteriores.

Ensayo de motilidad de *C. elegans*

El método utilizado para evaluar la motilidad de *C. elegans*, se realizó utilizando un sistema de registro de actividad locomotora que detecta interrupciones de micro haces infrarrojos, *WMicrotracker* (PhylumTech, Santa Fe, Argentina) (Risi et al., 2019). Luego de llegar al estadio L4, los gusanos fueron lavados 3 veces y recuperados en agua. Posteriormente se colocaron en placas *multiwells* de 96 pocillos de fondo plano; aproximadamente unos 50 gusanos por pocillo. Los primeros 30 minutos de medición se utilizaron para normalizar el 100% inicial de movimiento. Luego se agregaron las drogas a testear, en un volumen final de 100 μ L (Simonetta y Golombek, 2007). El ensayo se realizó con una duración total de 120 minutos en el cual se realizaron medidas cada 15 minutos (Figura 12).



Figura 12. Ensayo de motilidad de *C. elegans* utilizando el lector *WMicrotracker*, imagen creada con *BioRender.com*.

Ensayo de movilidad en medio líquido

Para poder cuantificar el defecto en la movilidad de los gusanos afectados por diferentes drogas, a los hermafroditas adultos jóvenes se los colocó en los pocillos de placas *multiwells*, utilizando agua como control o la droga en estudio diluida en agua, a un volumen final de 100/200 μl en cada pocillo. Para manipular los gusanos se utilizó el *wormpicker*, una herramienta que se fabricó montando un trozo de alambre de platino de 2 cm largo por 3 mm ancho en la punta de una pipeta Pasteur de vidrio. El alambre de platino se calentó y enfrió rápidamente y se pudo flamear con frecuencia (entre transferencias) para evitar contaminar los gusanos; el extremo del alambre que se usó para recoger gusanos, se aplanó ligeramente con un martillo y luego se limó (Stiernagle, 2006)). Utilizando el *wormpicker* se transfirieron entre 1 a 3 gusanos en cada pocillo, se los expuso a las diferentes condiciones experimentales, se los dejó estabilizar durante 3 minutos, y luego se contaron los eventos de cambio de curvatura durante un minuto utilizando un microscopio estereoscópico con zoom. Un evento fue considerado cuando se produjo un cambio en la curvatura (“*single thrash*”) del centro del cuerpo de un lado a la dirección opuesta.

Aislamiento y cultivo primario de larvas L1 de *C. elegans*

La técnica de cultivo primario de células de *C. elegans* correspondiente al estado larval L1 la hemos realizado para identificar canales únicos o corrientes macroscópicas activados por serotonina mediante registros de *patch clamp*.

La obtención de células embrionarias a partir de huevos de *C. elegans* y su posterior diferenciación a células musculares y neuronales se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Christensen y colaboradores (Christensen et al., 2002). El primer paso, consistió en aislar los huevos de manera estéril, mediante la técnica de sincronización, que se detalló anteriormente, con la diferencia de que luego de frenar la

reacción de la solución alcalina de hipoclorito, se realizaron los lavados y las siguientes etapas del protocolo, en condiciones de esterilidad bajo flujo laminar utilizando soluciones y agua estéril.

Los huevos obtenidos se trataron luego con quitinasa 1IU/ml (*Millipore Sigma Co., Louis, MO*) a temperatura ambiente durante 30-40 minutos, en rotación para digerir la cutícula de los huevos. Luego se centrifugaron a 6000 rpm y se resuspendieron en medio de cultivo L-15 (*Hyclone, Logan, UT*) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, con antibióticos (ampicilina y estreptomycin), y con sacarosa para incrementar la osmolaridad (Christensen et al., 2002). Luego mediante disgregación mecánica con pipeta automática, se disociaron los embriones, que luego fueron filtrados con un filtro de jeringa estéril *Durapore* de 5 μm (*EMD Millipore, Bedford, MA*) para separar las células de los restos de larvas y embriones no disociados. Se centrifugaron las células filtradas a 4000 rpm y se suspendieron en medio de cultivo L-15. Posteriormente se colocaron en placas de Petri de 35 mm sobre cubreobjetos, que previamente fueron tratados con poly-O-ornitina (durante 40 minutos y luego lavados 3 veces con agua milli-Q estéril) para permitir la adherencia de las células embrionarias. Luego de 2 horas de colocadas las células en los cubreobjetos, mantenidas en humedad adecuada, se agregó 2 ml del medio de cultivo L-15 suplementado.

Las células embrionarias se cultivaron a 20°C en medio L-15 suplementado y en humedad adecuada, y se diferenciaron por completo dentro de las 24 horas posteriores al aislamiento para parecerse a las células en etapa L1 (Strange et al., 2007). En cultivo, las células musculares L1 se detectaron por su forma característica de huso, similares a las células musculares de la pared del cuerpo *in vivo* (Christensen et al., 2002; Hernando et al., 2012; Rayes et al., 2007). Las células fueron utilizadas para los estudios electrofisiológicos de 1 a 5 días posteriores al aislamiento.

Aislamiento y cultivo primario de larvas L2-L3 de *C. elegans*

Para estudiar los patrones de expresión del receptor MOD-1 en estadios larvales post embrionarios, mediante corrientes macroscópicas o canales únicos, se realizó el protocolo de Zhang y colegas (S. Zhang et al., 2011), el cual, además, permite obtener células de mayor tamaño y diferente morfología que las embrionarias, lo que facilita la posterior obtención de corrientes macroscópicas.

Se sincronizaron los gusanos adultos grávidos con la solución alcalina de hipoclorito de sodio (NaOH 0,5 M y NaOCl 1%). Posteriormente, los huevos se sembraron en placas de Petri con NGM para que eclosionen. Al día siguiente, las larvas L1 se colocaron en placas NGM con un césped muy delgado de bacterias *E. coli* OP50, para que puedan agotar todas las bacterias al llegar a estadios L2-L3 y evitar restos de bacterias en la placa, disminuyendo así la probabilidad de contaminación posterior del cultivo celular. Cuando se observó la presencia de larvas L2-L3, en condiciones de esterilidad, se realizó el protocolo de aislamiento bajo flujo laminar. Se levantaron las larvas de la placa de agar con agua *milli-Q* estéril, y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml. Luego se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante, y se repitió las veces necesarias estos lavados, para que el *pellet* de nematodos se limpie de bacterias.

La cutícula, que es la principal barrera en larvas y adultos de *C. elegans*, está principalmente compuesta por colágeno, cuticulinas altamente entrecruzadas formando complejos insolubles, y glicoproteínas de superficie (Page y Johnstone, 2007). El protocolo implica el tratamiento de las larvas de *C. elegans* con una combinación de detergente y agente reductor seguida de digestión con proteasa que solubiliza eficazmente la cutícula de la larva, pero no mata las células (S. Zhang et al., 2011). Para ello, luego del último lavado, el *pellet* de larvas se colocó en un *Eppendorf* de 1,5 ml y se lo expuso a una solución SDS-DTT (HEPES pH 8, detergente aniónico SDS (dodecilsulfato sódico), agente reductor DTT (ditiotreitól), sacarosa y H₂O) a temperatura ambiente. Luego de 2 minutos, la reacción fue detenida con *Egg buffer* (12,5 ml de HEPES (1M) a pH 7,3, 29,5 ml de NaCl (2M), 1 ml de CaCl₂ (1M), 12 ml de KCl (2M), 1 ml de MgCl₂ (1M) y 444 ml de H₂O, esterilizado en autoclave), se centrifugó a 16000 g durante 1 minuto, y se realizaron 5 lavados más con *Egg buffer* y centrifugado. Posteriormente, se agregó pronasa E, que es una enzima capaz de digerir la capa de la cutícula basal y la cutícula

faríngea (Cox et al., 1981), se expuso el *pellet* de larvas a la pronasa por 7 a 9 minutos a temperatura ambiente. Se combinó con disrupción mecánica mediante pipeteo, para disociar los tejidos y liberar células individuales de manera más eficiente. Una vez que se observaron las células individuales, se filtraron con un filtro estéril *Durapore* de 5 μm (*EMD Milipore, Bedford, MA*), para luego colocarlas en cubreobjetos dispuestos en cápsulas de 35 mm, previamente tratados con poly-O-ornitina. Luego de 24 horas, se les agregó medio de cultivo L-15 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, antibióticos (solución de ampicilina y eritromicina) y sacarosa. Luego de 1 a 5 días, las células se utilizaron para realizar registros electrofisiológicos.

Subclonación de cDNA de MOD-1 en el vector pcDNA 3.1

Para la expresión transitoria de receptores en células de mamífero, en primer lugar, el cDNA (*complementary DeoxyriboNucleic Acid*) del receptor MOD-1, cedido por el laboratorio del Dr. H. Robert Horvitz fue subclonado en el vector pCDNA3.1 para expresión en células de mamífero.

Para separar el inserto del vector pGEMHE (vector para expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*) y cortar el vector pcDNA 3.1 se utilizaron las enzimas BamHI y XbaI. Se purificó el vector y el inserto, y mediante la enzima ligasa se obtuvo el cDNA de MOD-1 en el vector pcDNA3.1. Posteriormente fue verificado el constructo por secuenciación.

Expresión heteróloga de receptores

Para la expresión de los receptores se utilizó un sistema de expresión heteróloga transitoria. Los vectores conteniendo los cDNA se incorporaron mediante la técnica de transfección por precipitación con fosfato de calcio. Para ello se utilizaron cultivos

celulares BOSC23, derivadas de las células HEK 293 (Pear et al., 1993), con un 40-50% de confluencia. Las células se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco modified Eagle medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino y una solución de antibióticos (penicilina/estreptomicina) a 37 °C en atmósfera controlada de CO₂ al 5%.

Se incorporó una mezcla de 5 µg de ADNc de MOD-1 o 5-HT_{3A_{HC}} por placa de Petri de 35 mm y un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente GFP en proporción 1:20, para permitir la identificación de las células exitosamente transfectadas cuando son observadas con luz ultravioleta. Luego de 8-12 horas se les cambió el medio de cultivo y se dejaron en incubador por 24-72 horas. A ese tiempo se logró la expresión del receptor en la membrana celular y, se pudieron realizar los estudios electrofisiológicos.

Registros de *patch-clamp*

Para estudiar la actividad de los receptores presentes en la membrana de una célula se realizaron registros electrofisiológicos, mediante la técnica denominada "*Patch Clamp*", que permite detectar corrientes iónicas microscópicas o unitarias a través de un canal único, y corrientes iónicas macroscópicas a través del total de los canales iónicos en la célula. Se utilizaron dos configuraciones de la técnica: "*cell-attached*" para registros de canal único y "*whole-cell*" para corrientes macroscópicas (Ito, 2008) (Figura 13).

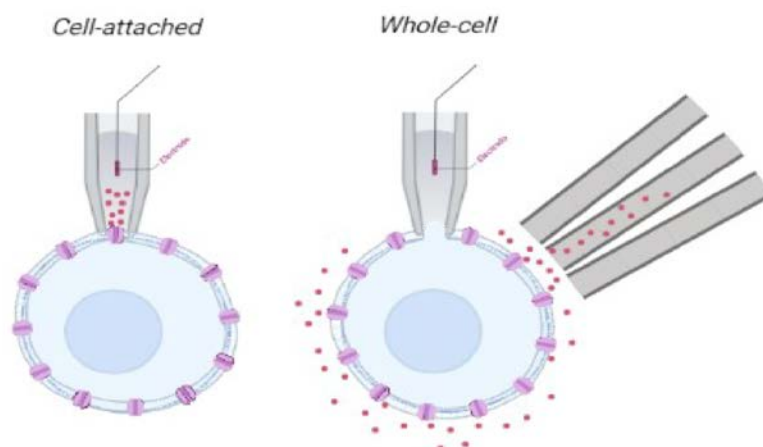


Figura 13. Técnica de Patch clamp, los puntos rojos refieren a los agonistas y/o moduladores utilizados. Imagen creada con BioRender.com.

Registros de canal único

Las corrientes de un solo canal se registraron en la configuración de célula adherida “*cell-attached*” a 20-25 °C, a un potencial de pipeta de -70 mV en las células BOSC 23 transfectadas y a -100 mV en las células de *C. elegans* (Hernando et al., 2012; Rayes et al., 2007).

Se utilizaron pipetas de vidrio con una resistencia de 5-7 MΩ, obtenidas a partir de tubos capilares de borosilicato (*Graner Glass Co, Claremont, CA*), mediante un estiramiento de los capilares utilizando un equipo llamado “*Puller*” (*SUTTER INSTRUMENT*, modelo P-97). Luego, las pipetas fueron revestidas con Sylgard (*Dow Corning; Midland, MI*) para minimizar el ruido al disminuir la capacitancia de vidrio dentro de la solución de baño; y luego fueron pulidas con calor para suavizar la terminación de la punta y mejorar el sello.

Las soluciones de baño y pipeta contenían 142 mM de KCl, 5,4 mM de NaCl, 1,8 mM de CaCl₂, 1,7 mM de MgCl₂ y 10 mM HEPES (pH 7,4). En el caso del receptor 5-HT_{3A}, para reducir el bloqueo del poro del receptor producido por cationes divalentes (Ca²⁺ y Mg²⁺) (Thompson y Lummis, 2006), se utilizó una solución de baño y de pipeta que contenía 142 mM de KCl, 5,4 mM de NaCl, 0,2 mM de CaCl₂ y 10 mM de HEPES (pH 7,4).

Las soluciones de las drogas utilizadas se agregaron disueltas a la solución de pipeta. Las corrientes de un solo canal se registraron utilizando un amplificador Axopatch 200B (*Molecular Devices Corp, CA*), los registros fueron digitalizados a intervalos de 5 μs y 200 kHz y filtrados a una frecuencia de 10 kHz mediante una interfaz Instrutech ITC-18 (*HEKA Instruments Inc.*). Los registros fueron adquiridos mediante el software Acquire (*Bruyton Corp, Seattle, WA*).

Los eventos de un solo canal del receptor 5-HT_{3A_{HC}} fueron idealizados utilizando el criterio de umbral de amplitud media utilizando el programa QuB 2.0.0.28 (www.qub.buffalo.edu) con filtro digital *low-pass* a 9 kHz. Las duraciones de abierto y cerrado se estimaron a partir de grabaciones idealizadas por la función de probabilidad de intervalo máximo (MIL) en QuB con un *dead time* de 0.03 ms, que es la duración del intervalo por debajo del cual los eventos no se pueden resolver. Por lo tanto, solo los eventos más largos que el *dead time* se utilizaron para construir los histogramas de duración.

Este análisis se realizó sobre la base de un modelo cinético cuyas curvas de función de densidad de probabilidad se ajustan adecuadamente a los histogramas correspondientes siguiendo los criterios de máxima verosimilitud. Los *bursts* y *clusters* de las aperturas de canales se identificaron como una serie de aperturas sucesivas (más de cinco) precedida y seguida de cierres superiores a una duración crítica. Los *clusters* correspondían a los tramos de mayor duración de sucesivas aperturas originadas en la misma molécula receptora. Estaban compuestos por episodios más cortos de aperturas sucesivas llamadas *bursts*. La duración crítica fue obtenida por el punto en el que el componente exponencial que describió los cierres más largos dentro de los *bursts* (o *clusters*) se cruzaban con el siguiente componente, minimizando así la fracción de eventos cerrados mal clasificados. Para definir *clusters*, se tomó la duración crítica (τ_{crit}) como punto de intersección entre el tercer y cuarto componente cerrado y su valor fue de ~10-20 ms. Para los *bursts*, la duración crítica cerrada se definió entre el segundo y tercer componente y fue de ~0,5 a 1,0 ms. Un aumento de 10 a 20 veces en el tiempo crítico para definir los *clusters* no afectó la duración media de los *clusters*, lo que indica que los *clusters* estaban bien definidos.

Los registros del receptor MOD-1 fueron analizados con el programa TAC 4.0.10 (*Bruyton Corporation, Seattle, WA*) utilizando el criterio de umbral de amplitud media, con un filtro de 10 kHz. De este análisis se obtuvieron histogramas de apertura y cierre de los canales, graficados en escala logarítmica. Estos histogramas muestran el logaritmo de la duración de los eventos en las abscisas y el número de eventos para cada tiempo en las ordenadas. El ajuste se logra mediante la suma de las funciones exponenciales por máxima probabilidad utilizando el programa TacFit 4.0.10 (*Bruyton*

Corporation, Seattle, WA). Los *clusters* fueron identificados tomando la duración crítica, que fue obtenida mediante el punto de intersección del componente principal y el siguiente componente en el histograma de tiempos cerrados.

La probabilidad de apertura (P_{apertura}) fue determinada experimentalmente calculando el tiempo en que el receptor permanece abierto dentro del tiempo total de duración del *cluster*.

Corrientes macroscópicas

Las corrientes macroscópicas se registraron en la configuración de célula completa, “*whole-cell*”, a temperatura ambiente, 20-25 °C, y a un potencial de pipeta de -50 mV en las células BOSC 23 transfectadas; y a -70 mV en las células de *C. elegans*, empleando los mismos instrumentos que en la configuración *cell-attached*. La solución de pipeta (*IntraCellular Solution*, ICS) para los registros realizados en células BOSC 23 contenía 134 mM de KCl, 5 mM de EGTA, 1 mM de MgCl₂ y 10 mM de HEPES (pH 7,3). La solución extracelular (*ExtraCellular Solution*, ECS) contenía 150 mM de NaCl, 1,8 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂ y 10 mM de HEPES (pH 7,4). Para el caso particular del receptor 5-HT_{3A}, la ECS contenía 150 mM de NaCl, 0,5 mM de CaCl₂ y 10 mM de HEPES (pH 7,4). Para los registros realizados con células de *C. elegans* la ICS contenía 134 mM de KCl, 10 mM de EGTA, 1 mM de MgCl₂ y 10 mM de HEPES a pH 7,3; y la ECS contenía 140 mM de NaCl, 3 mM de CaCl₂, 5 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 11 mM de glucosa y 5 mM de HEPES a pH 7,4.

Los registros de corrientes macroscópicas se obtuvieron utilizando un sistema de perfusión que permite el intercambio rápido de soluciones, de 0,1 a 1 ms, lo cual permite la activación de todos los receptores presentes en la membrana celular y de este modo, obtener las corrientes macroscópicas (Andersen et al., 2016; Corradi et al., 2009). Empleando reservorios que contenían las drogas disueltas en ECS, colocados por encima del sistema experimental, para que puedan fluir por gravedad, a través de mangueras que se conectaron a un sistema de válvulas de control manual, y en el otro extremo las

mangueras se conectaron a un sistema de salida formado por 3 tubos de diámetro pequeño, $\sim 0,3$ mm, que se posicionó dentro de la cápsula, cerca de las células. La salida de las soluciones a la cápsula de cultivo se controló por un sistema de válvulas (*VCS controller, ALA Scientific*), mencionado anteriormente, las cuales permitieron que se perfunda continuamente ECS sin droga, y cuando se aplicó un pulso, la válvula se abrió permitiendo la salida de la solución que contenía la droga disuelta en ECS por uno de los tubos, y cerrando, simultáneamente, el tubo que contenía ECS sin droga, por el lapso de tiempo que duró el pulso.

El tiempo de cambio de soluciones rápido se logró mediante el método de la pipeta abierta (*Open Pipette, OP*) antes de realizar los registros. Este método consistió en ubicar el sistema de perfusión en la posición adecuada que permitió la activación simultánea de todos los receptores presentes en la célula. Se dejó fluir ECS de lavado, de manera continua, y, por otro lado, se aplicó un pulso de ECS diluido al 50 % con agua *milli-Q* a una pipeta abierta (sin realizar un sello) a un potencial de pipeta de 0 mV. Este cambio de soluciones produjo un cambio repentino en la corriente que fue medido a través del amplificador de *patch-clamp*. Luego del ajuste adecuado de la posición del electrodo, el salto de corriente del sistema varió entre 0,1 y 1 ms (Andersen et al., 2016; Corradi et al., 2009).

Se eligió una célula verde bajo óptica de fluorescencia, lo cual indicó una alta probabilidad de que el receptor deseado exprese en dicha célula, y se la ubicó en la posición adecuada según el método de "*open pipette*". Las pipetas se fabricaron de la misma forma que para realizar registros de canal único, solo que no fueron recubiertas con Sylgard. Se generó un sello de alta resistencia utilizando una pipeta cargada con ICS, que a diferencia de la configuración "*cell-attached*", no contiene la droga en estudio. Luego se aplicó presión negativa para perforar la célula y tener acceso al interior celular. Se perfundió ECS conteniendo agonista, drogas a evaluar o ambos mediante el sistema de perfusión rápido.

Las corrientes macroscópicas fueron adquiridas usando el *software* WinWCP V5.3.7 (*Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde Glasgow, UK*), filtradas a 5 kHz, digitalizadas a 20 kHz y analizadas con el *software* Clampfit 10.4 (*Molecular Devices, CA, USA*). Cada corriente representa el promedio de tres a cinco

trazos individuales obtenidos del mismo sello. Se analizaron el pico de corriente; el *rising time*, que corresponde al tiempo que tarda la corriente en aumentar del 10 al 90% de su valor máximo ($t_{10-90\%}$); y el tiempo de decaimiento, obtenido por el ajuste de las corrientes con la función:

$$I(t) = I_0 [\exp(-t/\tau_d)] + I_\infty$$

donde I^0 e I_∞ corresponden a los valores del pico y del estado basal (en pA), respectivamente, y τ_d es la constante del tiempo de decaimiento (en ms).

Para las corrientes activadas por 5-HT, se ajustaron los decaimientos por una función exponencial doble según la ecuación:

$$I(t) = I_{fast} [\exp(-t/\tau_{d\ fast})] + I_{slow} [\exp(-t/\tau_{d\ slow})] + I_\infty$$

Para cuantificar la eficiencia del agonista para activar al receptor, se obtuvo el valor de EC_{50} , a partir de curvas de concentración-respuesta, obtenidas a partir de corrientes macroscópicas registradas a distintas concentraciones de agonista. Para ello, se aplicaron pulsos de ECS de 1,4 s para 5-HT_{3AHC} y de 3,5 s para MOD-1, que contenían diferentes concentraciones de serotonina y triptamina. Para carvacrol y timol, el pulso agonista se extendió hasta 8 s debido a su fase de ascenso más lenta. Relacionando la cantidad de corriente (I) a una determinada concentración de agonista (L) en base a la corriente máxima alcanzada ($I_{m\acute{a}x}$) se obtuvo una relación sigmoidea, la cual se ajustó a la ecuación de Hill:

$$I / I_{m\acute{a}x} = 1 / [1 + (EC_{50} / L)^{nH}]$$

donde nH es el coeficiente de Hill.

Cinética de recuperación de la desensibilización

Para estudiar la cinética de recuperación desde el estado desensibilizado para los receptores estudiados, se utilizó un protocolo de doble pulso de corrientes en configuración "whole-cell". Se aplicó un pulso de 1,5 s conteniendo la solución de 3 o 10

μM de 5-HT para el receptor 5-HT_{3A} y de 3,5 s y 100 μM de 5-HT para MOD-1. Finalizado el pulso, se aplicó un tiempo de lavado con ECS para remover el agonista, el cual varió a intervalos de 200 ms permitiendo distintos grados de recuperación. Luego del lavado se aplicó un segundo pulso de corriente con el agonista. Luego, se graficó la fracción de corriente recuperada en función del intervalo de tiempo entre el primer y el segundo pulso. De esta manera se obtuvo una curva de recuperación sigmoidea, lo que indicó un mecanismo que implica varios pasos para regresar al receptor desde el estado desensibilizado hasta el estado de reposo. Los puntos se ajustaron utilizando SigmaPlot 12.0 mediante la ecuación de aumento exponencial:

$$f(t) = a \times [1 - \exp(-t / \tau_{\text{rec}})]$$

donde t (s) es el intervalo de tiempo entre pulsos, τ_{rec} (s) es la constante de recuperación.

Curva Corriente-Voltaje

Para construir la curva de corriente-voltaje (I/V) para el receptor MOD-1, se determinó la corriente máxima a diferentes potenciales de membrana. La corriente máxima se relacionó con la obtenida a un potencial de mantenimiento de -100 mV para cada célula y se promedió para tres células y experimentos independientes diferentes. Los datos fueron ajustados por regresión lineal. Las concentraciones de cloruro fueron $[\text{Cl}^-]_{\text{out}} = 155,6 \text{ mM}$ y $[\text{Cl}^-]_{\text{in}} = 136 \text{ mM}$, correspondientes a la ECS y la solución intracelular, respectivamente. En nuestras condiciones experimentales, la ecuación de Nernst predice un potencial de equilibrio para el cloruro de -3,4 mV.

Protocolos de modulación del receptor

Para evaluar el efecto de los compuestos utilizados en función del estado conformacional de los receptores, es decir las acciones moduladoras, se utilizaron dos

protocolos de aplicación. El compuesto se aplicó antes del pulso de agonista, mediante un protocolo de preincubación (+/-); o se aplicó junto al agonista mediante un protocolo de co-aplicación (-/+).

Protocolo de preincubación (+/-)

Para determinar si el compuesto estudiado interaccionaba con el estado conformacional cerrado del receptor, se utilizó el protocolo de preincubación. El cual consistió en aplicar 3 pulsos de ECS conteniendo el agonista del receptor en estudio (corriente control). Luego, se realizó una incubación por un tiempo determinado de ECS con el compuesto a evaluar (sin agonista), y se aplicaron nuevamente 3 pulsos de ECS conteniendo el agonista (corriente tratada); por último, se lavó con ECS sin agonista durante el mismo tiempo que llevó la incubación anterior, y luego se aplicaron 3 pulsos de ECS con el agonista (corriente lavada) para registrar la corriente recuperada. Se promediaron los 3 pulsos en cada paso del protocolo y luego se evaluó el efecto del compuesto, promediando al menos 3 sellos distintos.

Protocolo de co-aplicación con el agonista (-/+)

Para determinar si el compuesto en estudio interactuaba con el estado conformacional abierto del receptor se empleó el protocolo de co-aplicación de la droga en estudio junto con el agonista del receptor. Para ello, se aplicaron 3 pulsos de ECS con el agonista (corriente control), y luego en la misma célula se aplicaron 3 pulsos de ECS conteniendo el agonista junto con la droga en estudio (corriente tratada). Se promediaron los 3 pulsos de cada paso del protocolo y se evaluó el efecto del compuesto entre corrientes control y tratadas, promediando en al menos 3 sellos distintos.

Microscopía

Para obtener las imágenes de fluorescencia se utilizó un microscopio laser confocal (Leica DMIRE2) con un objetivo de inmersión en agua 63X. Las imágenes fueron colectadas y procesadas con un “software” LCS (Leica). Se utilizaron las células del estadio larval L2-L3 de la cepa PD4251 que expresa GFP en todas sus células musculares (Fire et al., 1998).

Drogas

Las drogas utilizadas fueron: Serotonina (Serotonin hydrochloride, N°: H9523), 2-metil-serotonina (2-Methylserotonin maleate salt, N°: M109), Triptamina, Timol, Carvacrol, Levamisol, Piperazina, Ivermectina, Betaína, Isoguvacina y Muscimol de Sigma – Aldrich Co. (Merk KGaA, Darmstadt, Germany) y Sumatriptan, Hidroxicina, Cetirizina adquiridos en Farmacia.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio (media aritmética) \pm el desvío estándar (DE) del número de datos indicado (n). La significancia de las diferencias observadas se estableció mediante las pruebas: t de Student, para la determinación de las diferencias entre dos medias muestrales; o la F de ANOVA seguido de la prueba de Bonferroni, para las comparaciones múltiples. En todos los casos se comprobó los supuestos de normalidad y homocedasticidad considerando como significativo un valor de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Se utilizó *SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc)* para realizar todos los análisis de datos.



CAPÍTULO I

Modulación ortostérica y
alostérica del receptor

5-HT₃A

INTRODUCCIÓN

Los receptores de serotonina tipo 3 (5-HT₃) son canales iónicos dependientes de ligando que median respuestas excitatorias rápidas en el sistema nervioso central y periférico al convertir la unión del neurotransmisor 5-HT en una corriente catiónica. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores *Cys-loop*, junto con los receptores nicotínicos, de glicina y GABA.

Los receptores 5-HT₃ humanos se localizan en el sistema nervioso periférico y entérico, donde desempeñan un papel en la peristalsis, la motilidad intestinal, el tracto urinario y en varias funciones simpáticas, parasimpáticas y sensoriales. También se encuentran en muchas áreas del sistema nervioso central, con roles en una variedad de funciones que incluyen emesis, cognición y ansiedad (Juza et al., 2020).

Cinco subunidades del receptor 5-HT₃ humano han sido identificadas hasta el momento (5-HT₃A-E) (Niesler, 2011; Niesler et al., 2007; Price et al., 2017). La subunidad 5-HT₃A es la única que puede formar receptores homoméricos (5-HT₃A) (Hope et al., 1996; Maricq et al., 1991), mientras que las subunidades 5-HT₃B-E forman receptores heteroméricos combinándose con la subunidad 5-HT₃A (Brady et al., 2001; Corradi et al., 2015; Davies et al., 1999; Niesler, 2011; Niesler et al., 2007). La composición y estequiometría de las subunidades de los receptores nativos siguen siendo en su mayoría desconocidos.

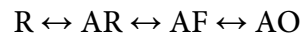
Al igual que los receptores *Cys-loop*, los 5-HT₃ son receptores homopentaméricos o heteropentaméricos que contienen un dominio extracelular (ECD), que posee el sitio de unión de agonista en las interfaces de las subunidades; un dominio transmembrana (TMD), que comprende el poro y está formado por cuatro hélices α de cada subunidad (TM1-TM4), con segmentos TM2 que forman las paredes del canal iónico; y un dominio intracelular (ICD), formado por un bucle intracelular entre TM3 y TM4 de cada subunidad y está involucrado en el tráfico, la modulación y la conductancia iónica (Corradi y Bouzat, 2016; Kelley et al., 2003; Pandhare et al., 2019). Los receptores homoméricos 5-HT₃A presentan 5 sitios de unión a serotonina, aunque se cree que la

activación máxima se produciría con la ocupación de 2-3 de los sitios (Corradi et al., 2015).

Los receptores 5-HT_{3A} homoméricos nativos tiene una conductancia de canal iónico muy baja que ha impedido la detección de aperturas de canal único (Kelley et al., 2003; Maricq et al., 1991). Basados en trabajos de Kelley (2003), en estudios previos del laboratorio se generó un receptor de ratón 5-HT_{3A} de alta conductancia, intercambiando tres argininas en el ICD por glutamina (Q), ácido aspártico (D) y alanina (A) (Bouzat et al., 2008; Corradi et al., 2009). El intercambio de estas argininas de la subunidad 5-HT_{3A} por los residuos QDA encontrados en posiciones homólogas en la subunidad 5-HT_{3B}, aumenta la conductancia del canal en el receptor 5-HT_{3A} (Kelley et al., 2003). Este estudio demostró que estos residuos son determinantes de conductancia. Se encontró que utilizando el receptor mutante de ratón 5-HT_{3A_{HC}} (de alta conductancia, por sus siglas en inglés, *high conductance*) es posible detectar los eventos de un solo canal en la configuración de *cell-attached*, y que las propiedades de activación y modulación no se ven afectadas con respecto al salvaje (Corradi et al., 2009; Niesler et al., 2003; Peters et al., 2006). Por lo tanto, el modelo de receptor de alta conductancia (5-HT_{3A_{HC}}) es una herramienta valiosa para estudiar en detalle los mecanismos de activación y modulación del receptor. Aprovechando este receptor de alta conductividad, se han generado previamente modelos que describen la cinética de activación por agonistas ortostéricos totales y parciales (Corradi et al., 2009; Corradi y Bouzat, 2014), y de inhibición por moduladores alostéricos negativos del receptor 5-HT_{3A} de ratón (Corradi et al., 2011).

El análisis cinético del receptor homomérico de ratón 5-HT_{3A} evidenció que sólo dos o tres sitios de los cinco sitios de unión ortostéricos idénticos deben estar ocupados para generar una respuesta máxima, y propuso la existencia de estados cerrados preactivados intermedios a partir de los cuales puede ocurrir la apertura del canal, ampliando el concepto de agonismo parcial (Corradi et al., 2009; Mott et al., 2001). El estado cerrado preactivado intermedio, denominado *flipped* o *primed*, se describió por primera vez en los receptores de glicina y nicotínicos. Este estado se describe en el esquema de activación entre el receptor ya ocupado por el agonista y el estado abierto

del canal y posee una alta afinidad por el agonista, dicho esquema se simplificó de manera lineal:



donde R es el receptor en reposo con el canal cerrado; AR es el receptor unido al agonista y con el canal cerrado; AF es el receptor unido al agonista en el estado preactivado y con el canal cerrado; y AO es el receptor unido al agonista y con el canal abierto.

Se ha propuesto que la eficacia de un agonista está determinada principalmente por su capacidad para cambiar la conformación del receptor desde un estado cerrado con agonista unido a estos estados preactivados (Corradi et al., 2009; Corradi y Bouzat, 2014; Lape et al., 2008; Mukhtasimova et al., 2009; Sivilotti y Colquhoun, 2016).

En salud humana, los antagonistas competitivos de 5-HT₃, mencionados anteriormente, los setrones, se utilizan para aliviar los síntomas gastrointestinales y también se los considera promisorios para tratamientos de otros desordenes neuronales y psiquiátricos (Gilmore et al., 2018; Juza et al., 2020; Walstab et al., 2010).

Los moduladores alostéricos se unen a los 5-HT₃ de forma no competitiva y estabilizan los estados cinéticos que pueden potenciar o reducir las propiedades del canal. Los moduladores alostéricos positivos (PAMs) no activarán directamente el canal, pero potenciarán el receptor para que se active a concentraciones de agonista más bajas y aumentaran la probabilidad del estado abierto. Estas propiedades tienen importantes efectos fisiológicos. Los defectos en la señalización de 5-HT₃ están relacionados con diversos trastornos psiquiátricos y abuso de sustancias, y los PAMs de 5-HT₃ son candidatos a fármacos atractivos para abordar estas afecciones (Gibbs y Chakrapani, 2021).

Se ha demostrado que los terpenoides actúan como moduladores alostéricos de los receptores 5-HT_{3A} al unirse probablemente a un sitio transmembrana. Mientras que algunos de ellos actúan como moduladores negativos, como el mentol, el citronelol y la boldina (Al Kury et al., 2018; Ashoor et al., 2013; Jarvis et al., 2016; Ziemba et al., 2015),

otros, como el carvacrol y el timol, han demostrado actuar como moduladores positivos con actividad agonista (ago-PAMs) (Lansdell et al., 2015; Ziemba et al., 2015).

Durante los últimos años, se han realizado importantes esfuerzos para dilucidar las bases estructurales y mecánicas de la activación de los receptores *Cys-loop*, lo que ha permitido conocer los procesos implicados en la activación de los neurotransmisores a través de los sitios ortostéricos (Gielen et al., 2018; Hassaine et al., 2014; Mukhtasimova et al., 2009; Polovinkin et al., 2018). Por el contrario, el mecanismo molecular subyacente a la activación alostérica sigue siendo un enigma.

Al igual que lo sucedido para el 5-HT_{3A} de ratón, la información sobre la función molecular del receptor 5-HT_{3A} humano se ha quedado atrás debido a su baja conductancia. Para superar esta brecha, se construyó la forma de alta conductancia del receptor 5-HT_{3A} humano y se exploró mediante registros macroscópicos de corriente y de canal único la cinética de activación por agonistas ortostéricos, tanto completo (5-HT) como parcial (triptamina), así como como la cinética de activación y modulación por los ligandos alostéricos carvacrol y timol.

En este primer capítulo de la Tesis, a través de la generación del receptor humano de alta conductancia lograda mediante mutaciones simultáneas de tres argininas en el dominio intracelular por los residuos QDA antes mencionado, se logró proporcionar la primera descripción mecánica de la activación y la modulación alostérica del receptor 5-HT_{3A} humano por dos terpenoides, timol y carvacrol; y además destacar las diferencias y similitudes con la activación a través de los sitios de unión del neurotransmisor. Esta información tiene implicaciones para el desarrollo de fármacos y proporciona un marco para comprender la activación y modulación por ligandos alostéricos en la familia de receptores *Cys-loop*.

OBJETIVO GENERAL

Debido a la participación del receptor 5-HT₃ en numerosas funciones vitales, y, por lo tanto, de suma importancia como blanco terapéutico, en este primer capítulo de la Tesis, el objetivo fue estudiar en detalle los mecanismos moleculares de activación y modulación de este receptor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descifrar a nivel de canal único, la cinética de activación de 5-HT₃A humano en presencia de su agonista endógeno, 5-HT, y de su agonista parcial, triptamina.
- Caracterizar la potenciación mediada por los moduladores alostéricos de 5-HT₃A humano estudiados, timol y carvacrol.
- Estudiar el mecanismo de activación alostérica y compararlos con el mecanismo de activación ortostérica del receptor 5-HT₃A humano.

RESULTADOS

Activación del receptor humano 5-HT_{3A_{HC}} por ligandos ortostéricos y alostéricos evaluada mediante corrientes macroscópicas.

En primer lugar, para evaluar si el receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano responde de manera similar al receptor nativo ya caracterizado, se procedió a describir las propiedades de activación macroscópica del receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano, construido a partir de la mutación de tres residuos en el dominio intracelular antes mencionado. Para ello, se transfectaron células BOSC23 con el ADNc de la subunidad del receptor de alta conductancia y se registraron corrientes macroscópicas en la configuración *whole-cell*.

La rápida aplicación de una concentración saturante de 5-HT (100 μ M) a las células provocó corrientes macroscópicas que decayeron durante el pulso de aplicación del agonista (Figura 14, A y C). El tiempo en que tarda en aumentar la señal desde el valor 10% al 90% del total de la corriente obtenida, $t_{10-90\%}$, considerado como el tiempo de activación (*rising time*) fue de 10 ± 4 ms. El decaimiento de la corriente en presencia de 5-HT se ajustó con dos componentes exponenciales, con constantes de tiempo de 92 ± 20 ms y 1100 ± 900 ms ($n = 5$). Estos valores fueron similares a los de las corrientes del receptor 5-HT_{3A} humano salvaje activadas por 100 μ M de 5-HT ($t_{10-90\%}$ de 16 ± 6 ms y constantes de tiempo de decaimiento de 120 ± 50 ms y 700 ± 400 ms ($n = 5$)). Para obtener una curva de concentración-respuesta para el 5-HT_{3A_{HC}}, se registraron corrientes a distintas concentraciones de 5-HT y se midieron las amplitudes máximas (picos) en función de la concentración del agonista. A partir de esta curva se obtuvo un valor de EC₅₀ de 2.6 ± 0.1 μ M (R^2 0.99, Figura 14 B), similar al reportado previamente para el receptor 5-HT_{3A} humano salvaje de baja conductancia (EC₅₀= 1–2 μ M) (Corradi et al., 2015; Lansdell et al., 2015). Así, se demostró que al igual que lo observado para el

5-HT_{3A} de ratón, las mutaciones no afectan las propiedades de activación del receptor humano.

Además, se exploró también la activación macroscópica del receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano por triptamina, que es un agonista parcial del receptor 5-HT_{3A} humano y de ratón (Corradi y Bouzat, 2014; Meiboom et al., 2013). En comparación con 5-HT, las corrientes provocadas por triptamina mostraron una fase de activación más lenta (Figura 14, A y C) y no decayeron durante el tiempo de aplicación del agonista (1,4 s). El tiempo medio de activación, obtenido a una concentración de saturación de triptamina (1 mM), fue de 200 ± 100 ms (Figura 14 A). La curva concentración-respuesta mostró una EC₅₀ de 197 ± 50 μ M y una respuesta máxima de $27 \pm 3\%$ en comparación con la provocada por 100 μ M de 5-HT ($R^2=0,98$), lo que indica que la triptamina es un agonista muy débil para el receptor humano 5-HT_{3A_{HC}} (Figura 14 B). Estos valores estaban en línea con los informados para el receptor 5-HT_{3A} humano de tipo salvaje (EC₅₀ de 100-200 μ M y 27% de la respuesta máxima (Meiboom et al., 2013)). Por tanto, nuestra caracterización macroscópica indica que el receptor de alta conductancia se comporta de manera similar al receptor 5-HT_{3A} nativo de baja conductancia.

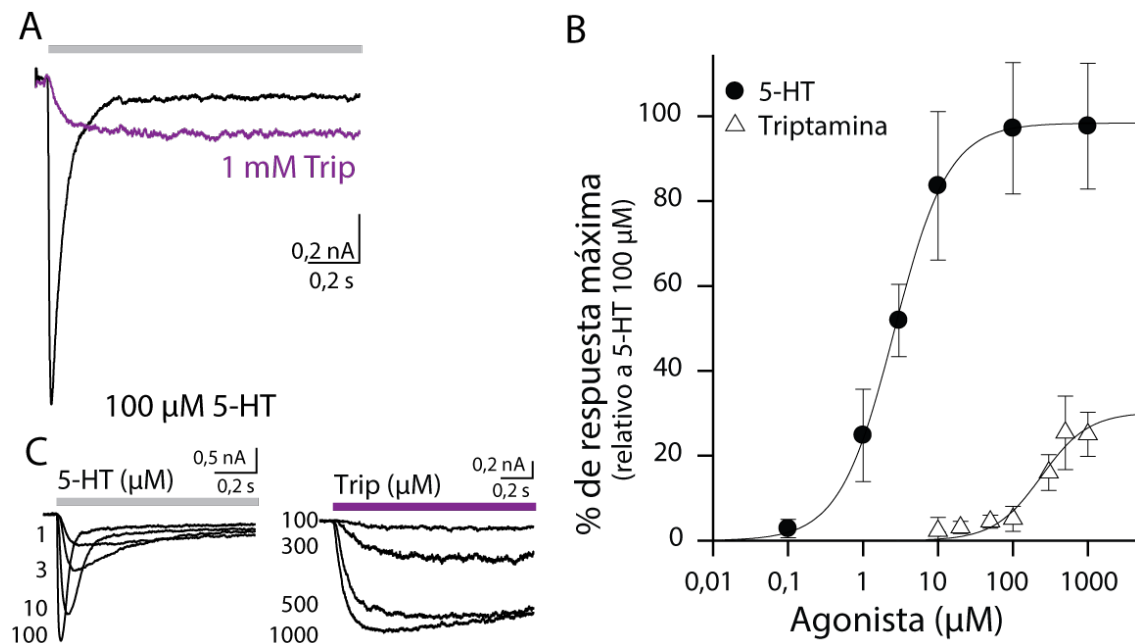


Figura 14. A) Corrientes macroscópicas obtenidas a partir del receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano luego de la aplicación de 5-HT y triptamina en las concentraciones indicadas. Potencial de pipeta: -50 mV. B) Curvas de concentración-respuesta para los distintos agonistas. Las amplitudes fueron

normalizadas con respecto a las corrientes obtenidas con 100 μM de 5-HT. Los datos corresponden a la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes. C) Corrientes obtenidas a diferentes concentraciones de cada agonista.

El carvacrol y el timol son dos monoterpenos fenólicos que se han caracterizado macroscópicamente como agonistas parciales alostéricos y moduladores alostéricos positivos del receptor 5-HT_{3A} humano (ago-PAMs) (Lansdell et al., 2015; Ziemba et al., 2015).

Se registraron las corrientes macroscópicas del receptor 5-HT_{3A_{HC}} provocadas por estos ligandos, en un rango de concentración de 1 μM a 1 mM (Figura 15, B y C). Las concentraciones de terpenoides superiores a 1 mM produjeron inestabilidad de la membrana y no pudieron evaluarse.

Los perfiles de respuestas macroscópicas fueron similares para ambos agonistas, pero diferentes a los provocados por 5-HT. A todas las concentraciones de carvacrol y timol, incluso a concentraciones de saturación, las corrientes decayeron más lentamente que en presencia de 5-HT (Figura 15 A), y no se logró la desensibilización completa durante el tiempo de aplicación del agonista (12 s) (Figura 15 C). Las corrientes obtenidas a partir de concentraciones saturantes de carvacrol o timol mostraron fases de activación significativamente más lentas con respecto a las observadas con 5-HT, con tiempos medios de activación ($t_{10-90\%}$) de 2280 ± 810 ms para 1 mM de carvacrol ($n=4$) y de 4850 ± 750 ms para 1 mM de timol ($n = 5$) (Figura 15 A). Las curvas de concentración-respuesta obtenidas mostraron valores de EC_{50} más altos (62 ± 2 μM para carvacrol y 117 ± 30 μM para timol, $R^2=0,98$) y respuestas máximas más pequeñas (84 ± 1 % para carvacrol y 84 ± 8 % para timol) que las obtenidas por 5-HT (Figura 15 B). Estos resultados estuvieron en estrecha concordancia con los informados para el receptor 5-HT_{3A} salvaje humano (Lansdell et al., 2015).

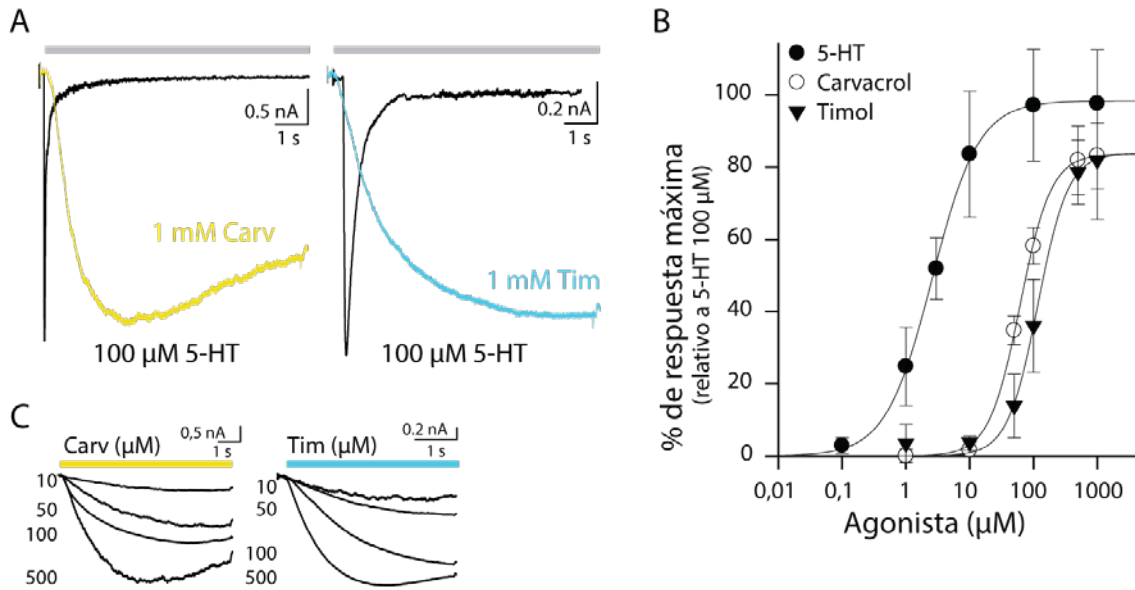


Figura 15. A) Corrientes macroscópicas obtenidas a partir del receptor $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$ humano luego de la aplicación de 5-HT y carvacrol o timol en las concentraciones indicadas. Potencial de pipeta: -50 mV . B) Curvas de concentración-respuesta para los distintos agonistas. Las amplitudes fueron normalizadas con respecto a las corrientes obtenidas con $100\ \mu\text{M}$ de 5-HT. Los datos corresponden a la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes. C) Corrientes obtenidas a diferentes concentraciones de cada agonista.

En conclusión, estos resultados obtenidos al evaluar la activación macroscópica de $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$ evidenciaron que dicho receptor de alta conductancia es un buen modelo para estudiar la activación y modulación a nivel de canal único, ya que la activación, tanto alostérica como ortostérica de dicho receptor, es indistinguible de la del receptor de tipo salvaje.

Potenciación del receptor $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$ humano por carvacrol y timol evaluada a nivel macroscópico

Para investigar la acción del carvacrol y el timol como moduladores alostéricos positivos del $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$ humano, se registraron corrientes macroscópicas activadas por

50 μM de triptamina, una concentración cercana al valor de EC_{20} , en ausencia o presencia de carvacrol (10 μM) o timol (20 μM), que corresponden a concentraciones cercanas a sus valores EC_{10} (Figuras 15 y 16).

Cuando se aplicó 50 μM de triptamina sola, se detectaron respuestas típicas de activación lenta y fases de decaimiento lento, mientras que la aplicación de timol o carvacrol a estas bajas concentraciones evidenció corrientes muy pequeñas o insignificantes (Figura 16 A). Sin embargo, la co-aplicación de 50 μM de triptamina junto con carvacrol (10 μM) o timol (20 μM) mostró una marcada potenciación de las corrientes macroscópicas. Para ambos compuestos, las corrientes máximas aumentaron ~ 3 veces con respecto a las corrientes provocadas por triptamina sola en la misma célula (Figura 16 B).

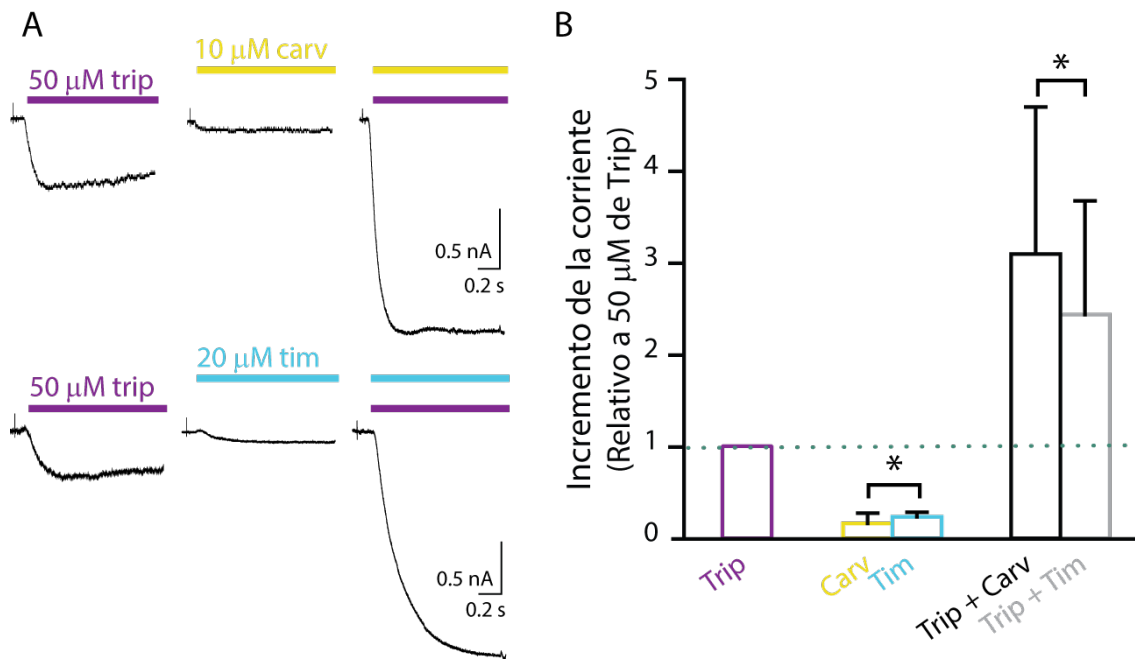


Figura 16. A) Corrientes macroscópicas evocadas por 50 μM de triptamina (violeta), 10 μM de carvacrol (amarillo), 20 μM de timol (celeste), 50 μM triptamina/10 μM carvacrol y 50 μM triptamina/20 μM timol. Potencial de membrana: -50 mV. B) Incremento del pico de la corriente obtenida con triptamina luego de la aplicación de triptamina junto con carvacrol (10 μM) o timol (20 μM). Los picos de corrientes fueron normalizados con respecto a los obtenidos con triptamina sola en la misma célula. Los valores corresponden a la media \pm DE de al menos 3 experimentos independientes. “*” = $p < 0,001$.

Estos resultados confirman que, sumado a su función como agonistas parciales, el carvacrol y el timol también actúan como moduladores alostéricos positivos del receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano y que el efecto potenciador se evidencia a concentraciones más bajas que para su efecto agonista.

Activación del receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano por agonistas ortostéricos evaluado a nivel de canal único

Luego de caracterizar la activación del receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano a nivel macroscópico, y aprovechando la forma de alta conductancia del receptor, se exploró el perfil de activación a nivel de canal único, en la configuración de *cell-attached*.

Para todas las concentraciones evaluadas de 5-HT (1-30 μ M), la activación se observó en forma de eventos de apertura de $4,5 \pm 0,4$ pA (a -70 mV de potencial de membrana) formando *bursts* de alta probabilidad de apertura que, a su vez, aparecieron agrupados en episodios de activación largos y bien definidos denominados *clusters* (Figura 17). Cada *cluster* corresponde al episodio de activación de una única molécula receptora que se recupera de una desensibilización de larga duración. A 1 μ M de 5-HT, se obtuvieron *clusters* de ~ 290 ms con alta probabilidad de apertura ($P_{\text{apertura}} \sim 0,94$) (Figura 17; Tabla 1). Los *clusters* estaban compuestos por tramos más cortos, denominados *bursts*, con duraciones medias de ~ 130 ms, que se definieron como eventos de apertura en rápida sucesión separados por cierres más breves de 1 ms (Figura 17; Tabla 1). Los histogramas de tiempo de estado abierto se describieron con 3 componentes diferentes, cuyas duraciones fueron $\sim 0,05$ ms, $\sim 0,40$ ms y ~ 23 ms (Figura 17; Tabla 1).

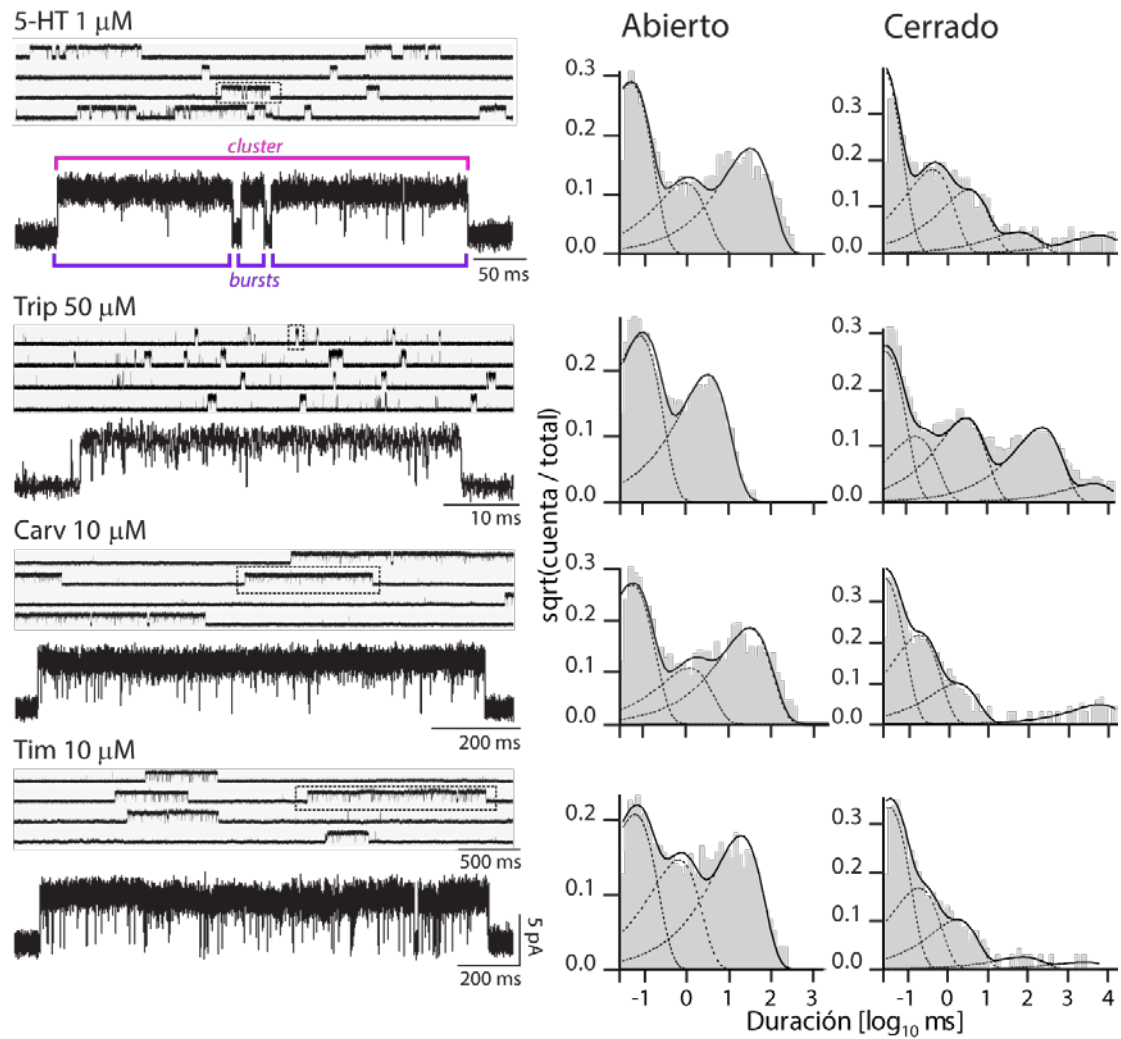


Figura 17. Registros de canal único del receptor $5\text{-HT}_{3A_{HC}}$ obtenidos con 5-HT, triptamina, carvacrol o timol a baja (arriba) y alta (abajo) resolución. Los registros fueron obtenidos en la configuración cell-attached a -70 mV de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

A concentraciones elevadas de 5-HT, se evidenció una reducción en la duración del componente de estado abierto más lento (Tabla 1), probablemente debido al bloqueo del canal abierto (Corradi et al., 2009). Para describir este efecto, se utilizó el esquema de bloqueo lineal de canal abierto (Neher y Steinbach, 1978) trazando el inverso de las duraciones del estado abierto en función de las concentraciones de agonista para obtener la correspondiente constante de bloqueo directo (k_{+b}) (Figura 18). Se obtuvo un valor de k_{+b} de $5,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($R^2 = 0,98$), similar al observado para el receptor $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$ de ratón (Corradi et al., 2009).

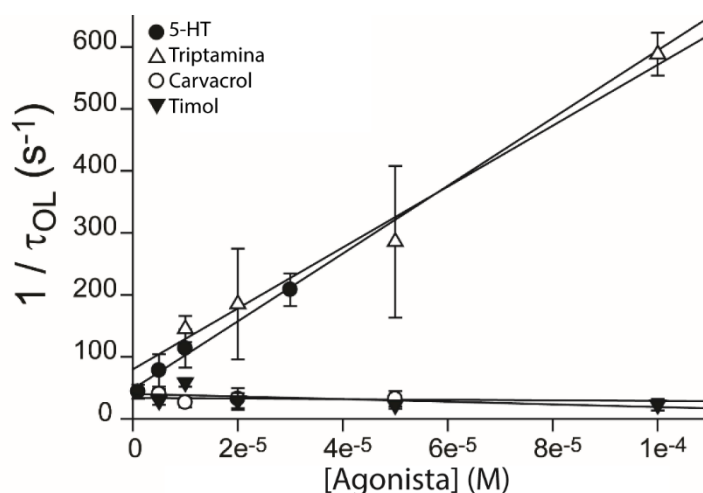


Figura 18. Bloqueo del receptor $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$. Cada curva representa la relación entre el inverso de la duración media del componente más largo (OL) y la concentración de agonista para cada agonista. Los datos se ajustan mediante la ecuación lineal $1/\tau_{OL} = \alpha + k_{+b}[\text{agonista}]$ donde k_{+b} es la constante de velocidad de bloqueo directo y α es la velocidad aparente de cierre del canal. Los valores de τ_{OL} se obtuvieron de los histogramas de tiempo abierto correspondientes y se expresan como la media \pm SD de al menos tres registros para cada condición.

Los histogramas de tiempo de estado cerrado se describieron por 5 o 6 componentes, los 3 más breves corresponden a cierres dentro de *clusters* (Figura 17; Tabla 1). Los valores de duración media de los cierres intra-*clusters* fueron constantes desde el rango de concentración de 5-HT de 1 a 30 μM , lo que evidencia que no hay dependencia de la concentración de agonista en el perfil de activación de este receptor (Figura 17; Tabla 1).

En comparación con 5-HT, la activación por triptamina (10–100 μM) se observó mayormente como *bursts* breves de alta P_{apertura} de ~ 30 a 60 ms, que no se fusionaron en *clusters* de larga duración (Figura 17; Tabla 1). Los histogramas de tiempo de estado abierto se describieron sólo por 2 componentes, siendo la duración del componente abierto de mayor duración de ~ 6 ms a concentraciones por debajo de 20 μM de triptamina (Tabla 1). Los *bursts* se definieron por un tiempo de cierre crítico de 0,8 ms, resultando en las duraciones medias descritas en la Tabla 1, y no mostraron dependencia significativa de la concentración de agonista.

Del mismo modo que con 5-HT, se observó una reducción en la duración del componente de estado abierto más largo con el aumento de la concentración de triptamina, lo que podría sugerir un bloqueo del canal abierto. El valor de $k+B$ obtenido fue $4,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($R^2 = 0.98$), similar al observado para 5-HT (Figura 18). Los histogramas de tiempo de estado cerrado se describieron por 4 o 5 componentes (Figura 17).

Ligando	[μM]	O_L (ms) (Area rel.)	Burst (ms) (P_{apertura})	Cluster (ms) (P_{apertura})	n
5-HT					
	1	23 ± 6 (0.49 ± 0.19)	136 ± 54 (0.99 ± 0.01)	287 ± 123 (0.94 ± 0.05)	13
	5	13 ± 4 (0.57 ± 0.08)	90 ± 34 (0.99 ± 0.01)	221 ± 83 (0.91 ± 0.04)	5
	10	8.8 ± 2.4 (0.58 ± 0.09)	94 ± 53 (0.98 ± 0.01)	246 ± 131 (0.89 ± 0.04)	4
	30	4.8 ± 0.6 (0.51 ± 0.10)	38 ± 10 (0.97 ± 0.01)	98 ± 50 (0.78 ± 0.07)	10
Triptamina					

10	6.9 ± 1.0 (0.67 ± 0.28)	29 ± 17 (0.99 ± 0.01)		3
20	5.5 ± 2.1 (0.80 ± 0.23)	62 ± 33 (0.99 ± 0.01)		4
50	3.2 ± 1.2 (0.75 ± 0.12)	26 ± 10 (0.99 ± 0.01)		10
100	1.7 ± 0.1 (0.82 ± 0.17)	30 ± 9 (0.98 ± 0.01)		5

Carvacrol

5	25 ± 5 (0.59 ± 0.27)	437 ± 133 (0.99 ± 0.01)	$2,542 \pm 998$ (0.94 ± 0.02)	3
10	38 ± 11 (0.47 ± 0.20)	472 ± 163 (0.99 ± 0.01)	$1,734 \pm 910$ (0.98 ± 0.02)	8
20	31 ± 17 (0.66 ± 0.09)	397 ± 16 (0.99 ± 0.01)	$3,615 \pm 1,563$ (0.96 ± 0.02)	4
50	31 ± 12 (0.44 ± 0.16)	477 ± 57 (0.99 ± 0.01)	$1,013 \pm 367$ (0.99 ± 0.01)	4

Timol

5	34 ± 8 (0.58 ± 0.22)	392 ± 200 (0.99 ± 0.01)	$1,539 \pm 771$ (0.99 ± 0.01)	4
10	17 ± 2 (0.27 ± 0.19)	110 ± 80 (0.99 ± 0.01)	$1,226 \pm 459$ (0.97 ± 0.02)	3
20	34 ± 14	313 ± 51	$1,761 \pm 495$	5

		(0.32 ± 0.14)	(0.99 ± 0.01)	(0.98 ± 0.01)	
50	45 ± 12		546 ± 247	1,215 ± 184	3
		(0.32 ± 0.12)	(0.98 ± 0.01)	(0.97 ± 0.01)	
100	39 ± 15		531 ± 139	1,581 ± 803	6
		(0.54 ± 0.13)	(0.99 ± 0.01)	(0.98 ± 0.01)	
Triptamina					
Carvacrol					
50	4.4 ± 1.1		232 ± 151	1,861 ± 890	6
10	(0.83 ± 0.11)		(0.97 ± 0.01)	(0.96 ± 0.02)	
Triptamina					
Timol					
50	2.7 ± 0.1		120 ± 100	560 ± 445	3
10	(0.72 ± 0.04)		(0.96 ± 0.01)	(0.94 ± 0.02)	

Tabla 1. Parámetros de canal único del receptor 5-HT_{3AHC}. "O_L" corresponde a la duración del componente más largo de estado abierto. "n" corresponde al número de réplicas independientes para cada condición.

En conclusión, se evidenció el carácter de agonista parcial de la triptamina, por las principales diferencias en el patrón de activación con respecto al observado con 5-HT. Dichas diferencias fueron la reducción de las duraciones de los tiempos de estado abierto y la ausencia de *clusters* de larga duración.

Activación del receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano por ligandos alostéricos evaluada a nivel de canal único

Se investigó el patrón de activación del receptor 5-HT_{3A_{HC}} por los terpenoides carvacrol y timol a nivel de canal único.

En presencia de diferentes concentraciones de carvacrol (5-50 μ M) o timol (5-100 μ M) y en ausencia de 5-HT, los registros muestran eventos de apertura agrupados en *clusters* de larga duración, similares al patrón de activación de 5-HT (Figura 17). Los histogramas de tiempo de estado abierto se describieron por 3 componentes que no mostraron dependencia de la concentración de ligandos (Figura 17; Tabla 1). A 5 μ M, las duraciones medias de los componentes de estado abierto fueron de \sim 0,02, \sim 0,9 y \sim 25 ms para carvacrol, y de \sim 0,07, \sim 1,6 y \sim 34 ms para timol, similares a los de activación con 5-HT (Tabla 1). Los histogramas de tiempo de estado cerrado se describieron mediante 5 o 6 componentes, los 3 componentes más breves corresponden a cierres dentro de los *clusters* (Figura 17). La duración de los *clusters* y la P_{apertura} dentro de los *clusters* fueron constantes en todas las concentraciones probadas. Curiosamente, los *clusters* provocados por los agonistas alostéricos fueron de \sim 6 a 10 veces más largos que los observados con 5-HT (\sim 2500 ms con 5 μ M de carvacrol y \sim 1500 ms con 5 μ M de timol) (Figura 17; Tabla 1).

Se concluye que, a pesar de que los perfiles de activación macroscópicos demostraron que el timol y el carvacrol se comportan como agonistas parciales del receptor 5-HT_{3A} humano, el patrón de la activación alostérica mediante registros de canal único, fue más parecido al de activación por 5-HT que al de un agonista parcial ortostérico genuino como la triptamina. En presencia de los agonistas alostéricos, los receptores 5-HT_{3A_{HC}} se activan formando *clusters* de larga duración y de alta probabilidad de apertura, marcadamente diferentes a los provocados por la triptamina. Además, las duraciones de los *clusters* fueron significativamente más prolongados para los ligandos alostéricos que para 5 HT, indicando una mayor eficacia.

Potenciación del receptor 5-HT_{3A_{HC}} humano por carvacrol y timol evaluada a nivel de canal único

Para evaluar la potenciación del receptor 5-HT_{3A_{HC}} por carvacrol y timol, se obtuvieron registros de eventos de canal único activados por 50 μ M de triptamina en presencia o ausencia de 10 μ M de los terpenoides (Figura 19). Se decidió utilizar la triptamina como agonista porque es esperable que un aumento en la duración debido a la potenciación se detecte más claramente en los *bursts* evocados por triptamina que en los *clusters* de larga duración evocados por 5-HT, lo que permite una mejor distinción entre los procesos de activación y modulación. Los registros de canal único demostraron que la activación ocurre como *clusters* de larga duración y alta probabilidad de apertura, cuyos valores fueron similares a los obtenidos en presencia de cada agonista alostérico en ausencia de triptamina (Figura 19; Tabla 1). Sin embargo, para ambas condiciones (triptamina + carvacrol y triptamina + timol), los histogramas de tiempo de estado abierto se describieron con el mismo número de componentes y duraciones medias similares a las obtenidas en presencia de triptamina sola (Figura 19; Tabla 1).

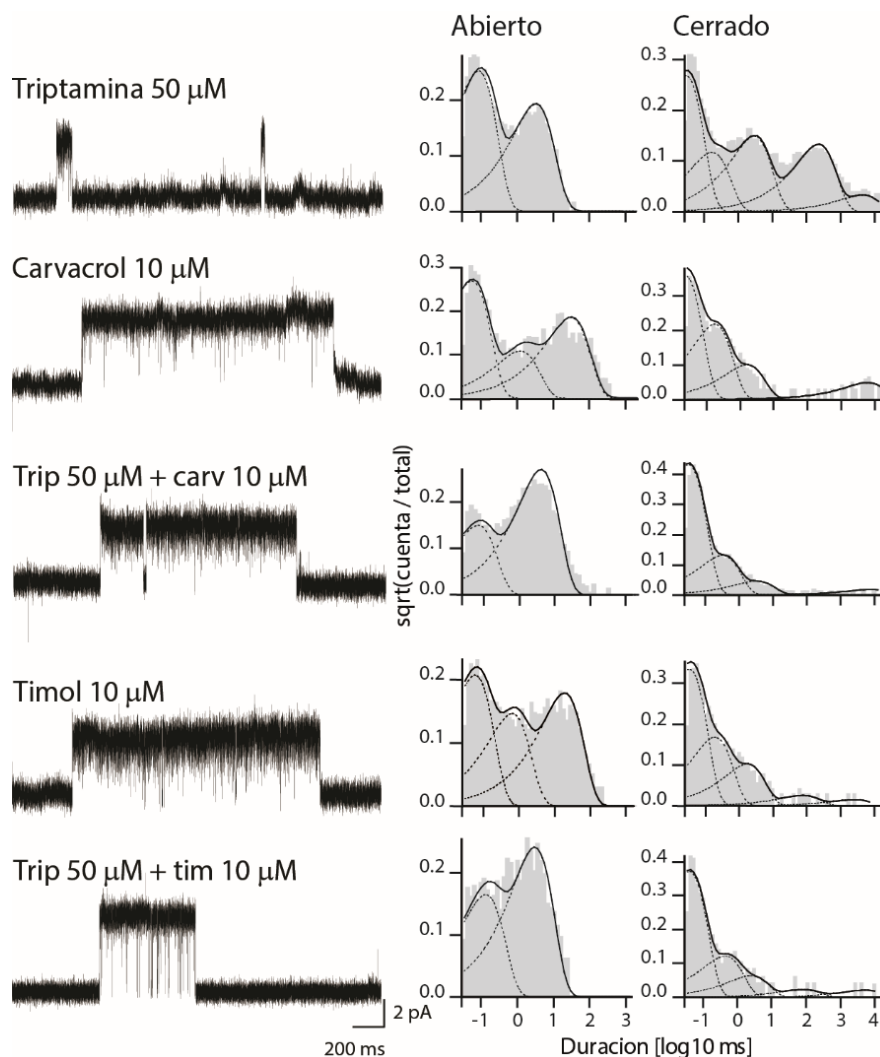


Figura 19. Trazos representativos de registros de canal único del receptor $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$ obtenidos con triptamina, carvacrol, timol, triptamina + carvacrol, y triptamina + timol. Los registros fueron obtenidos en la configuración cell-attached a -70 mV de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

La aparición de *clusters* más largos en presencia de terpenoides puede deberse a una disminución de la velocidad de desensibilización debido a su acción PAM, un mecanismo de acción que se ha descrito para PAMs de otros receptores *Cys-loop* (Chatzidaki y Millar, 2015).

La razón por la que ocurre este patrón mixto, que muestra breves aperturas como las provocadas por la triptamina y *clusters* de larga duración como los provocados

por el carvacrol o el timol solos, no está clara aún. Un posible argumento es que la duración de las aperturas estaría gobernada principalmente por el agonista ortostérico (triptamina), mientras que la duración del *cluster* estaría regida mayormente por el modulador alostérico (carvacrol o timol). Otra explicación podría ser que la triptamina, al igual que ocurre con otros agonistas, actúe como un bloqueador de canal abierto y que este efecto bloqueador se manifieste cuando se combina con carvacrol o timol porque las aperturas son más prolongadas. El efecto final se evidenciaría como una reducción de la duración de las aperturas en relación a la observada en presencia de terpenoides como agonistas.

DISCUSIÓN

En este primer capítulo de este trabajo de Tesis se describió, a nivel de canal único, las bases mecánicas que subyacen a las diferencias entre la activación y potenciación ortostérica y alostérica en el receptor *Cys-loop* 5-HT₃A humano.

El hecho de que los receptores *Cys-loop* sean importantes blancos farmacológicos para un gran número de trastornos ha hecho que se preste atención a descifrar los mecanismos de modulación farmacológica. La modulación farmacológica se puede lograr a través de sitios ortostéricos y alostéricos, lo que da como resultado un gran espectro de estructuras, sitios y mecanismos químicos.

Varios ago-PAMs de los receptores *Cys-loop* son fármacos terapéuticos establecidos, como el anestésico pentobarbital que actúa en los receptores GABA (Muroi et al., 2009) y la ivermectina, antihelmíntico que actúa en los canales de cloruro activados por glutamato de invertebrados (Lynagh y Lynch, 2012). Para los receptores 5-HT₃A, se han propuesto compuestos que actúan como moduladores alostéricos negativos como fármacos o estructuras principales para reducir las náuseas y los vómitos inducidos por la quimioterapia (Al Kury et al., 2018; Pertz et al., 2011). Sin embargo, también se ha demostrado que los compuestos que actúan como agonistas alostéricos inducen antinocicepción, con lo cual el estudio de ago-PAMs tiene un impacto en el desarrollo de herramientas terapéuticas (Ferreira Junior et al., 2017).

Los estudios electrofisiológicos y estructurales han proporcionado información sobre los mecanismos de activación a través de los sitios ortostéricos, las estructuras identificadas y las vías propuestas involucradas (Bouzat y Sine, 2018; Gielen et al., 2018; Sauguet et al., 2014; Solt et al., 2007). Sin embargo, los mecanismos de activación alostérica de los receptores 5-HT₃ siguen siendo poco conocidos y no se han abordado en su totalidad.

Para 5-HT₃A, la activación a nivel de canal único solo se puede estudiar utilizando el receptor triple mutante de alta conductancia porque su baja amplitud de canal no

permite la detección de eventos de apertura por *cell-attached*. En este trabajo de Tesis, se demostró que las propiedades de activación macroscópica del receptor de alta conductancia humano son similares a las del receptor de tipo salvaje. Además, los estudios de canal único del receptor quimérico que contiene la secuencia $\alpha 7$ en el dominio extracelular y 5-HT₃A en el dominio transmembrana ($\alpha 7$ -5-HT₃A) (Rayes et al., 2009), y el receptor nicotínico $\alpha 7$ (Andersen et al., 2013) han demostrado que las mutaciones de los tres residuos cambian la conductancia pero no afectan la cinética de canal único de los receptores. Por tanto, la forma de alta conductancia del receptor 5-HT₃A humano es un modelo válido para definir la cinética.

La actividad de canal único de la forma de alta conductancia del receptor 5-HT₃A humano no se ha descrito antes. Se descubrió que la amplitud del canal es similar a la del receptor de ratón de alta conductancia 5-HT₃A y su patrón de activación de un solo canal también mantiene las características principales del receptor de ratón: el receptor se activa en eventos de apertura sucesivos que forman *bursts* y estos a su vez, se asocian para formar *clusters* de larga duración y alta probabilidad de apertura y sin dependencia de la concentración de agonistas. Cada *cluster* corresponde a la activación de una única molécula del receptor que oscila entre distintos estados abiertos y cerrados hasta finalizar por desensibilización (Corradi et al., 2009).

Una característica principal de la activación del receptor 5-HT₃A es que el aumento de la concentración de 5-HT de 1 a 10 μ M aumenta la respuesta macroscópica del ~ 25 al $\sim 85\%$, mientras que no afecta el patrón de canal único que, a su vez, muestra los mismos *clusters* de ~ 300 ms y P_{apertura} de $\sim 0,9$ en el rango de concentración de 10 veces. Estos hallazgos indican que los *clusters* no incluyen los pasos de asociación y disociación de agonistas. Por tanto, la dependencia observada de la concentración de agonista de las respuestas macroscópicas puede deberse al aumento en la frecuencia de *clusters* individuales con la concentración de agonista. Se ha informado de un comportamiento similar para otros receptores *Cys-loop* homoméricos (Bouzat et al., 2008; Krashia et al., 2011; Rayes et al., 2005).

Como agonistas alostéricos, se utilizaron terpenoides que son compuestos fenólicos monocíclicos presentes en aceites esenciales de plantas aromáticas ampliamente utilizados en la medicina tradicional (Tsuchiya, 2017). Los antagonistas de

5-HT₃ caracterizados pertenecen a alcoholes monoterpénicos. El mentol se usa contra el SII debido a que bloquea los receptores 5-HT_{3A}, pero con una potencia menor que el citronelol. Actualmente, el mentol es el único terpeno con una acción antiemética descrita relacionada con la inhibición de 5-HT_{3A}. Los terpenos, como el citronelol y el geraniol, se encuentran con frecuencia en los aceites esenciales de una variedad de plantas. Los terpenos son en su mayoría hidrofóbicos y fácilmente absorbidos por la mucosa o la piel, y pueden cruzar la barrera hematoencefálica para posteriormente modular los receptores *Cys-loop* (Ziemba et al., 2015). A nivel molecular los terpenoides, ejercen múltiples efectos en toda la familia de receptores *Cys-loop* en ambos, vertebrados e invertebrados, incluida la activación, potenciación e inhibición (Hernando et al., 2019; Price y Lummis, 2014). En los receptores 5-HT_{3A}, se ha demostrado que los terpenoides actúan como inhibidores alostéricos o como ago-PAM. En particular, mediante registros macroscópicos de corriente se demostró anteriormente que el carvacrol y el timol actúan como agonistas parciales y potenciadores de los receptores 5-HT_{3A} (Lansdell et al., 2015). Estudios de *docking* molecular y mutaciones puntuales han propuesto que la activación por estos compuestos terpenoides ocurre de manera alostérica en un sitio ubicado en una cavidad entre subunidades en la región transmembrana, precisamente entre las hélices TM1 y TM2 de una subunidad y las hélices TM3 y TM4 de la subunidad adyacente (Lansdell et al., 2015). Partiendo de estos estudios macroscópicos previos de la acción de terpenoides sobre el receptor 5-HT₃, se combinaron registros de corrientes macroscópicas con registros de canal único para lograr un entendimiento más profundo y detallado de su mecanismo de acción. Se encontró que los terpenoides por sí solos activan al 5-HT_{3A}, generando respuestas macroscópicas. Sin embargo, la velocidad de activación de la corriente es más lenta y su amplitud menor que la evocada por 5-HT. Por otro lado, la evaluación de la activación a nivel de canal único mostró un perfil de activación similar al de 5-HT, formado por *clusters* muy prolongados.

Se analizó, por lo tanto, las posibles explicaciones de la aparente discrepancia de la actividad de los compuestos terpenos entre el nivel macroscópico (respuestas submáximas y más lentas) y el nivel de un solo canal (*clusters* de larga duración y alta probabilidad de apertura).

Se sabe que el bloqueo de canales abiertos provocado por el agonista a altas concentraciones puede reducir las respuestas macroscópicas máximas (Colquhoun, 1998). Este mecanismo ha explicado la baja eficacia de la 2-metil-5-hidroxitriptamina para los receptores 5-HT_{3A} de ratón (Corradi y Bouzat, 2014). Sin embargo, no se detectó una reducción clara en la duración en los tiempos de estado abierto, en la duración del *cluster* o en la probabilidad de apertura a concentraciones altas de carvacrol o timol, lo que indica que no hay bloqueo de canales y, por lo tanto, se puede descartar el bloqueo de terpenoides como mediador de respuestas macroscópicas submáximas.

Además, los estudios de canal único demostraron *clusters* de gran duración. Previamente se había demostrado en el laboratorio que dichos *clusters* incluyen estados cerrados que corresponden a estados conformacionales intermedios o pre-activos (Corradi y Bouzat, 2014). A partir de estos estados preactivados se produce la apertura rápida del canal, que es rápida para agonistas completos pero lenta para los parciales (Corradi y Bouzat, 2014; Lape et al., 2008; Mukhtasimova et al., 2009). Nuestros registros demostraron que los *clusters* fueron similares para canales activados por 5-HT y los terpenoides, indicando que la duración de los estados preactivados es similar para ambos agonistas. Sin embargo, fue muy diferente para el agonista parcial ortostérico, triptamina, que no mostró *clusters* y solamente *bursts* aislados. Por lo tanto, el paso de preactivación lento puede explicar la eficacia reducida observada a nivel macroscópico para la triptamina, pero no para los terpenoides

Se investigó si los ligandos alostéricos también podrían provocar los mismos cambios en el sitio de unión de agonista ortostérico que son necesarios para iniciar la apertura del canal. Los estudios estructurales y computacionales en los receptores *Cys-loop* sugirieron que el bucle C, que es uno de los tres bucles que forman la cara principal del sitio de unión, adopta una conformación abierta en ausencia de agonista, y se cierra al rotar hacia la cavidad para tapar la molécula del agonista unida, un evento asociado con el estado conformacional intermedio o pre-activo (en el cual el receptor aun estando unido al ligando con mayor afinidad se encuentra en un estado cerrado), y con la apertura del canal. Los agonistas parciales ortostéricos producen un cierre incompleto en concordancia con su estado preactivo reducido (Billen et al., 2012; Bouzat et al., 2008; Gao et al., 2005; Hibbs et al., 2009; Lasala et al., 2018; Miller y Smart, 2010;

Mukhtasimova et al., 2009; Unwin y Fujiyoshi, 2012). No hay información experimental sobre el cierre del bucle C por agonistas alostéricos. Sin embargo, los estudios computacionales que utilizaron un modelo de homología del receptor nicotínico $\alpha 7$ mostraron que un agonista alostérico afectaba la libertad conformacional del bucle C y producía la activación del canal mediante una intercomunicación entre los sitios alostéricos y ortostéricos (Grazioso et al., 2015). Además, un estudio que utilizó un modelo de método gaussiano en 23 proteínas demostró que los movimientos de los sitios alostéricos están altamente correlacionados con los movimientos de los sitios ortostéricos (Ma et al., 2016). Por tanto, es posible que a pesar de unirse al sitio transmembrana, los terpenoides induzcan alostéricamente el cierre del bucle C ubicado en el dominio extracelular.

Otra posible explicación de la discrepancia entre las observaciones macroscópicas y microscópicas es la accesibilidad de los terpenoides a los sitios de unión alostéricos a través de la membrana plasmática, lo que probablemente conduce a la fase de aumento lento de las corrientes macroscópicas, determinada para la activación alostérica por la ivermectina de los canales de cloruro activados por glutamato (Atif et al., 2019). Los estudios experimentales y computacionales han demostrado que el timol y el carvacrol se incorporan a la membrana lipídica de manera saturable y que el timol en solución acuosa tiende a autoagregarse cuando la concentración aumenta por encima de un valor crítico (Ferreira et al., 2016; Lansdell et al., 2015; Shapiro y Guggenheim, 1995; Turina et al., 2006; Ultee et al., 1999). Además, el número de sitios alostéricos requeridos para la activación puede diferir del de los sitios ortostéricos, como se determinó previamente para los agonistas alostéricos de los receptores GABA, para los cuales se reportó que se requiere la ocupación de cinco sitios para su máxima activación por ligandos alostéricos, mientras que se requiere de solo dos sitios para los ligandos ortostéricos (Amin y Subbarayan, 2017). Por lo tanto, la saturación máxima de los sitios alostéricos puede no ocurrir en las condiciones utilizadas para los registros a nivel macroscópico, pero puede ocurrir durante las mediciones de corriente de un solo canal, en estado estable y más largo.

En este capítulo de Tesis se mostró la primera caracterización a nivel de canal único de la activación del receptor 5-HT_{3A} humano por ligandos alostéricos. Se logró

descifrar las diferencias entre la activación ortostérica y alostérica de este receptor. El potencial terapéutico de los ligandos alostéricos se deriva de su capacidad para modular la función del receptor mientras mantienen intacto el patrón nativo de activación del receptor, es por ello que son de creciente interés como herramientas de investigación y terapéuticas para toda la familia de receptores *Cys-loop*.



CAPÍTULO II

Explorando el receptor
MOD-1 de
Caenorhabditis elegans
como un novedoso
blanco para la terapia
antihelmíntica.

INTRODUCCIÓN

Los helmintos son un grupo de organismos parásitos o de vida libre. Son organismos eucariotas multicelulares, pertenecientes al reino animal. Los gusanos parásitos pueden causar enfermedades graves, como la fascioliasis, la ascariasis, la tricuriasis y la teniasis. Estos organismos se clasifican en una variedad de filos, incluyendo Annelida, Platyhelminthes y Nematoda. El filo Annelida contiene los gusanos llamados gusanos de sangre, los cuales son comunes en el ganado y los animales domésticos. El filo Platyhelminthes contiene los gusanos parásitos planos, como la tenia y los gusanos de intestino. El filo Nematoda contiene los gusanos redondos con forma de hilo, que pueden ser parásitos o vivir en una amplia gama de entornos, incluido el suelo, como la lombriz intestinal, los ascarídidos, y *C. elegans*. Estos gusanos redondos pueden infectar a los seres humanos, así como a los animales domésticos (Kaplan, 2004; Perry y Randolph, 1999; Sepúlveda-Crespo et al., 2020; Stepek et al., 2006).

La helmintiasis es una enfermedad infecciosa causada por gusanos parásitos. Estos gusanos parásitos pueden vivir en el tracto digestivo de su hospedador, algunos incluso pueden vivir dentro de los tejidos. Los parásitos se transmiten cuando una persona ingiere alimentos o agua contaminada con huevos de parásitos o larvas. Los síntomas de la helmintiasis pueden variar según el tipo de parásito, pero generalmente incluyen anemia, diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso. El tratamiento generalmente implica el uso de medicamentos antiparasitarios (Organización Mundial de la Salud, OMS).

Resulta necesario el desarrollo de estrategias para prevenir, diagnosticar, tratar y controlar las helmintiasis alrededor del mundo. Estas estrategias deben incluir el uso de antihelmínticos, el control de la transmisión, el control de la infestación, la mejora de la educación y la prevención de la reinfestación (OMS). Los nematodos parásitos tienen un gran impacto negativo en la salud humana. Una gran proporción de la población mundial, particularmente la de los países subdesarrollados y en vías de desarrollo, alberga infecciones por helmintos, incluidos *Brugia malayi*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Loa duodenales* y *Onchocerca volvulus* (Bethony et al., 2006; Puspita et al., 2020). Los nematodos parásitos también infectan

varios tipos de organismos, incluidos insectos, animales y plantas, y por lo tanto son muy perjudiciales para la salud veterinaria y la productividad agrícola en todo el mundo. La quimioterapia preventiva es necesaria para eliminar la morbilidad asociada con la helmintiasis humana y animal, así como para reducir las pérdidas en la producción agrícola y animal. Sin embargo, la aparición de nematodos resistentes debido al uso intensivo de los mismos a los limitados fármacos disponibles se ha convertido en una preocupación mundial para la salud veterinaria y humana (Fissiha y Kinde, 2021). Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos fármacos y/o nuevos blancos farmacológicos.

El nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* comparte las principales características del plan corporal del nematodo como la cutícula y la organización del sistema nervioso junto con otros aspectos fisiológicos. El sistema neuromuscular muestra un alto grado de conservación dentro del filo Nematoda, lo que permite hacer ensayos y extraer hipótesis muy valiosas en cuanto a comportamiento de los nematodos como la puesta de huevos, la alimentación y la motilidad. Dicha afirmación se debe a que comparte características fisiológicas y farmacológicas con los nematodos parásitos, incluidos los receptores de neurotransmisores, siendo sensible a la mayoría de los fármacos antihelmínticos (Angstadt et al., 1989; Holden-Dye, 2007). Por lo tanto, al superar las desventajas de trabajar con parásitos, *C. elegans* se ha utilizado como modelo para el descubrimiento de fármacos antihelmínticos.

Los receptores *Cys-loop* son los principales objetivos de los fármacos antihelmínticos en parásitos y *C. elegans* (Beech y Neveu, 2015; Holden-Dye y Walker, 2006) dado que desempeñan funciones clave en todo el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados. Los efectos que los antihelmínticos tienen sobre estos receptores conllevan a la pérdida de funciones vitales en los gusanos, como la motilidad, la alimentación o la puesta de huevos, lo cual finalmente causa la muerte del nematodo.

En los vertebrados, los receptores *Cys-loop* pueden ser canales catiónicos, que incluyen receptores nicotínicos (nAChR) y de serotonina tipo 3 (5-HT₃), o canales aniónicos, que incluyen receptores GABA y de glicina. El repertorio en los invertebrados es notablemente más amplio y comprende también canales aniónicos activados por glutamato, ACh o serotonina (5-HT). La falta de estos receptores en los vertebrados los convierte en blancos farmacológicos atractivos para las terapias antiparasitarias. De

hecho, el canal de cloruro activado por glutamato es el blanco del fármaco antihelmíntico ampliamente utilizado, la ivermectina (Lynagh y Lynch, 2012). Sin embargo, la resistencia de los nematodos por su uso extendido y masivo se ha convertido en un problema para la salud animal y humana.

La serotonina modula la mayoría de los procesos clave en *C. elegans*, tales como comportamientos y funciones fisiológicas como el bombeo faríngeo, la puesta de huevos, la locomoción, el apareamiento y el aprendizaje (Gürel et al., 2012).

C. elegans posee un receptor *Cys-loop* llamado MOD-1, que es un canal de cloruro que media respuestas hiperpolarizantes rápidas en neuronas y músculos. Si bien los receptores MOD-1 y 5-HT₃ comparten la capacidad de responder a 5-HT, difieren en su función en que 5-HT₃ es un canal catiónico no selectivo, mientras que MOD-1 es un canal de cloruro que no se encuentra en los vertebrados (Dent, 2006; Yaakob et al., 2018). Como receptor *Cys-loop* aniónico, MOD-1 muestra aproximadamente un 30% de identidad con los receptores GABA y glicina.

MOD-1 se expresa en las neuronas y los músculos de *C. elegans* que controlan los comportamientos, como la locomoción, la puesta de huevos, la alimentación, el bombeo faríngeo, la toma de decisiones y el aprendizaje aversivo (Churgin et al., 2017; Iwanir et al., 2016; Y. Zhang et al., 2005). También está presente en los nematodos parásitos y se ha demostrado que MOD-1 de *Haemonchus Contortus* muestra un 80 % de identidad con MOD-1 de *C. elegans* (Beech et al., 2013). Una búsqueda de datos del transcriptoma para el parásito nematodo filarial *Loa filaria*, *Brugia malayi* y *Wuchereria bancrofti* reveló secuencias de codificación predichas para ortólogos del gen *mod-1* (Beech et al., 2013).

5-HT inhibe la locomoción en *C. elegans* cuando se aplica de forma exógena, un efecto que se ha propuesto que está mediado tanto por SER-4 como por MOD-1 (Gürel et al., 2012; Law et al., 2015). La parálisis inducida por 5-HT difiere de la parálisis espástica o flácida clásica y se ha sugerido que se debe principalmente a la incapacidad de los gusanos para integrar de manera efectiva las entradas sensoriales en conflicto para iniciar y mantener la locomoción hacia adelante/hacia atrás (Law et al., 2015).

MOD-1 se ha propuesto como un posible blanco farmacológico para controlar los nematodos parásitos de las plantas. En el nematodo del quiste de la papa, *Globodera*

pallida, MOD-1 participa en una vía de señalización de la serotonina que es esencial para la activación del estilete que se utiliza para acceder a la raíz huésped (Crisford et al., 2020).

Por lo tanto, los ligandos que actúan en MOD-1 pueden ser fármacos antihelmínticos atractivos que se espera que muestren perfiles toxicológicos seguros debido a la alta selectividad por los nematodos. Sin embargo, se sabe poco sobre la función y la farmacología molecular de MOD-1.

Teniendo en cuenta que MOD-1 puede convertirse en un nuevo blanco antihelmíntico importante para humanos, animales y cultivos, aquí se revelaron aspectos novedosos de su función y selectividad de fármacos, desde el nivel molecular hasta el organismo, e identificaron nuevos ligandos de MOD-1 que pueden proporcionar atractivos compuestos líderes para la prometedora actividad antihelmíntica.

OBJETIVO GENERAL

En este segundo Capítulo de Tesis, el objetivo general fue explorar el receptor *Cys-loop* MOD-1 en el organismo *C. elegans* y utilizarlo como plataforma para contribuir al desarrollo de nuevos fármacos. Nuestra hipótesis es que cuanto más profundamente se conozcan las propiedades farmacológicas y funcionales de receptores *Cys-loop* de nematodos, sus roles y su capacidad de ser modulados, será posible avanzar en la búsqueda de nuevos y más selectivos agentes antihelmínticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar mediante estudios electrofisiológicos el receptor MOD-1, en células musculares y neuronales de *C. elegans* tanto a nivel de canal único como a nivel de corrientes macroscópicas.
- Caracterizar la farmacología del receptor MOD-1 expresado en células de mamífero, y descifrar sus diferencias con la farmacología del receptor 5-HT_{3A} humano.
- Completar los estudios de nivel molecular con estudios de comportamiento en el organismo nematodo, analizando los fármacos estudiados en ensayos electrofisiológicos y compararlos con el efecto de dichos fármacos sobre del comportamiento de los gusanos.
- Analizar el efecto de los fármacos en el comportamiento de la cepa mutante que carece del receptor MOD-1, para confirmar su rol como blanco farmacológico de dichas drogas.

RESULTADOS

Estudios electrofisiológicos de MOD-1 en células musculares y neuronales de *C. elegans*

Para comenzar a estudiar a MOD-1 como nuevo blanco promisorio para la terapia antiparasitaria, se realizaron estudios electrofisiológicos, tanto a nivel de registros de canal único, en la configuración “*cell-attached*”, como de corrientes macroscópicas, en la configuración “*whole-cell*”, utilizando cultivos de células embrionarias que *in vitro* se diferencian en células correspondientes al estadio larval L1 de *C. elegans* (Christensen et al., 2002). Para ello, se llevó a cabo el aislamiento y cultivo de las células en estado embrionario, a partir de los huevos de *C. elegans*.

De acuerdo a trabajos previos, el gen *mod-1* se expresa en un subconjunto de neuronas ventrales, de la cabeza y de la cola, y no se encuentra en células musculares (Ranganathan et al., 2000). Un trabajo posterior logró identificar la expresión del gen *mod-1* en los músculos de puesta de huevos vm2 y además en músculos y neuronas que controlan directamente la locomoción. Por ejemplo, en las larvas L3 o más jóvenes, observaron una fuerte expresión en todos los músculos de la pared del cuerpo, las células que ejecutan directamente los movimientos de curvatura del cuerpo durante la locomoción de *C. elegans*. En estadios larvales L4 y adultos esta expresión de *mod-1* en músculos de la pared corporal se redujo, aunque fue aún detectable. Estos autores también encontraron que la expresión del receptor MOD-1 se superpuso con las neuronas motoras GABAérgicas del cordón ventral. Estas neuronas motoras liberan GABA directamente sobre los músculos de la pared del cuerpo para generar el movimiento de curvatura corporal durante la locomoción (Gürel et al., 2012).

Registros de corrientes macroscópicas activadas por 5-HT en células L1

Con el fin de detectar corrientes macroscópicas activadas por 5-HT en células de *C. elegans* se decidió comenzar con registros en la configuración *whole-cell* sobre células L1 cultivadas *in vitro*. Para los estudios electrofisiológicos se utilizó la cepa PD4251, que expresa la proteína verde fluorescente GFP en todas las células musculares, lo que permite una mayor diferenciación entre las células neuronales y musculares; y la cepa NC782 que expresa GFP en neuronas de la cola, la cabeza y ventrales.

A partir de estas cepas se aislaron células embrionarias que luego de 48 h en cultivo se diferencian a neuronas y células musculares pertenecientes al estadio larval L1, tal como se describe en Metodología.

Las mediciones de corrientes macroscópicas en la configuración *whole-cell* sobre estas células presentan una alta complejidad debido a: i) Las células son pequeñas, miden de 2 a 10 μm de diámetro, en particular las neuronas son extremadamente pequeñas midiendo 1-2 μm ; ii) las micropipetas de vidrio deben tener un tamaño de punta muy pequeño (0,5 μm), lo que genera un aumento de la resistencia de entrada que dificulta el sellado; iii) acceder a la configuración *whole-cell* por medio de la succión en la mayoría de los casos rompe o daña la célula probablemente debido al tamaño tan pequeño de las células. Se encontró que se puede mejorar aplicando un pulso de alto voltaje (*zapping* eléctrico); iv) la estabilidad de los sellos se pierde luego de pulsos sucesivos de agonista y, en general, el acceso al interior celular se resella por lo que es imposible realizar varias aplicaciones de diferentes compuestos sobre la misma célula. Además, en el caso de la cepa con las neuronas marcadas con GFP, el porcentaje de obtención de dichas células neuronales en el cultivo fue muy bajo, encontrando muy pocas células viables verdes, hecho que disminuyó marcadamente la posibilidad de obtener registros (Christensen et al., 2002; Sangaletti y Bianchi, 2013).

A pesar de estas dificultades, se demostró, por primera vez, que la 5-HT a un rango de concentración (10 μ M, 100 μ M y 1mM) y a un potencial de pipeta de -70 mV evoca corrientes macroscópicas en células musculares y neuronales L1.

Sin embargo, la baja probabilidad de detectar corrientes, y la baja magnitud de éstas, sumado a la dificultad de la técnica no permitieron un análisis cuantitativo detallado de las propiedades de las respuestas macroscópicas.

Los registros de células completas obtenidos en células musculares L1, aplicando 10, 100 y 1000 μ M de 5-HT, dio como promedio un pico de corriente de $49,9 \pm 31,5$ pA (n = 5). La corriente no mostró un decaimiento importante durante el curso de aplicación del agonista.

En células neuronales, solo se obtuvo un registro de corriente de 178 pA generada por aplicación de 10 μ M de 5-HT (Figura 20)

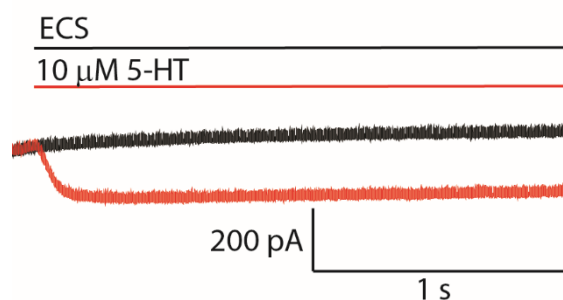


Figura 20. Corriente macroscópica de células de *C. elegans*. Trazos representativos de registros de corrientes macroscópicas de células neuronales en cultivo del estadio L1 de la cepa NC782 (neuronas de la cola, la cabeza y ventrales marcadas con GFP), obtenidos en la configuración whole-cell. Se aplicó 3 pulsos de 10 μ M de 5-HT (trazo rojo promediado) y luego 3 pulsos con ECS (trazo negro promediado). Potencial de pipeta: -70 mV.

Para intentar superar estas dificultades en la técnica, y con el fin de obtener registros cuantificables, se utilizó la técnica de aislamiento celular de otros estados larvales desarrollada por Zhang et al. (2011), con algunas modificaciones. Esta técnica de aislamiento permite obtener cultivos de células correspondientes a larvas L2 a L4 de *C. elegans*. Las células en estos estadios son de mayor tamaño que las de L1 y por lo

tanto se supuso que los registros serían menos dificultosos y las corrientes de mayor amplitud. Por ejemplo, las células aisladas de larvas L4 son en promedio 2,7 veces más grandes que las L1. Sin embargo, este método presentó otras dificultades, que incluyeron la realización de un laborioso protocolo para obtener un cultivo de alto rendimiento, y sobre todo que dicho cultivo sea libre de contaminación. Además, la técnica limita el estudio en células neuronales, ya que las neuronas constituyen menos del 10% de las células aisladas (S. Zhang et al., 2011) (Figura 21).

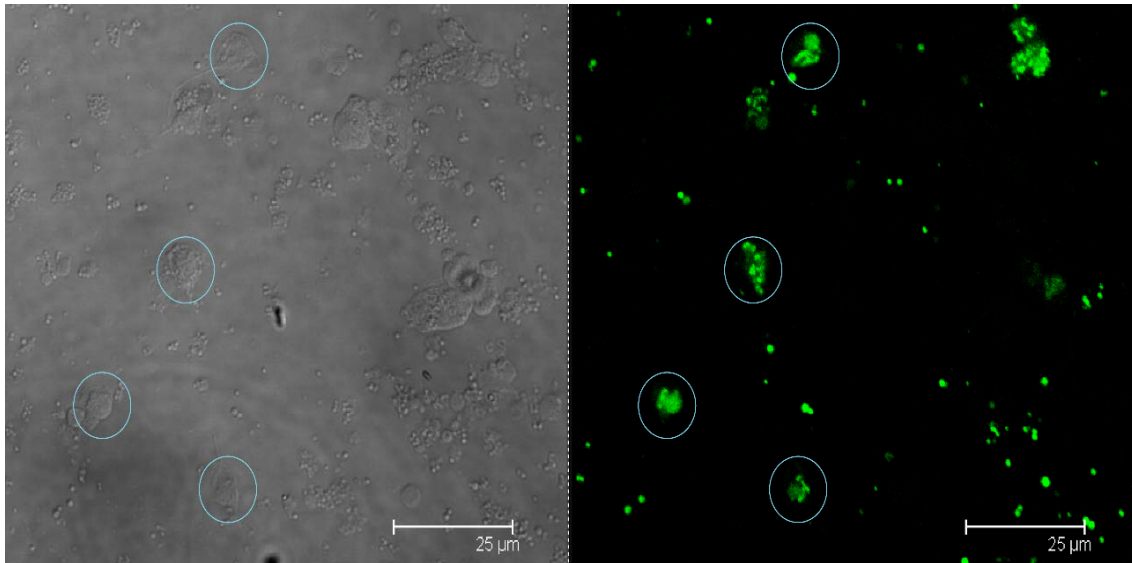


Figura 21. Fotografías de microscopía confocal de cultivos de células musculares de larva L2-L3. Cultivo celular correspondiente a la cepa salvaje PD4251 (*myo-3::GFP*) que expresa GFP en todas las células musculares del cuerpo del gusano. Izquierda: foto por contraste de fases. Derecha: fluorescencia, GFP en verde. Escala 25 µm.

Utilizando este método de cultivo, con células correspondientes a L2-L3 se logró la detección de una corriente en célula muscular de 353 pA activada por 10 µM de 5-HT.

Si bien estos estudios de corrientes macroscópicas nos permitieron demostrar la presencia de canales iónicos funcionales que responden a 5-HT tanto en células neuronales como musculares, y en diferentes estados larvales, no nos permitieron hacer un estudio sistemático y cuantitativo de las corrientes. Por tal motivo, se decidió explorar la posibilidad de realizar registros de canal único.

Registros de canal único en células L1

Sobre cultivos primarios de células embrionarias aisladas de *C. elegans* se realizaron registros de canal único en la configuración *cell-attached* en presencia de 5-HT en la solución de pipeta. Se seleccionaron para este estudio las células musculares de la cepa salvaje (PD4251 que expresa GFP en células musculares) dado que en el laboratorio se han realizado varios estudios en similares condiciones de otros receptores *Cys-loop* (Hernando et al., 2012, 2019; Turani et al., 2018).

Con este enfoque experimental se detectó, por primera vez, canales unitarios activados por 5-HT. Los canales correspondientes a la activación con 5-HT aparecen como eventos de aperturas breves, en general aislados, de una amplitud aproximada de 5 pA a un potencial de pipeta de 100 mV. La media de la duración de los eventos fue de $0,19 \pm 0,03$ ms, $n = 4$ (Figura 22). Sin embargo, los eventos de apertura registrados no son fácilmente detectados en presencia de 5-HT. Por ejemplo, utilizando 1 μM de 5-HT se logró 1 solo registro sobre 24 sellos estables (de diferentes cultivos), con 10 μM y 100 μM de 5-HT se obtuvieron 6 registros de más de 100 sellos (de diferentes cultivos). Como se puede apreciar, el porcentaje de sellos activos fue de solo el 6 %. Otra vez, este enfoque experimental no nos permitió realizar un análisis de las propiedades de las corrientes unitarias para caracterizar a MOD-1 en estado nativo.

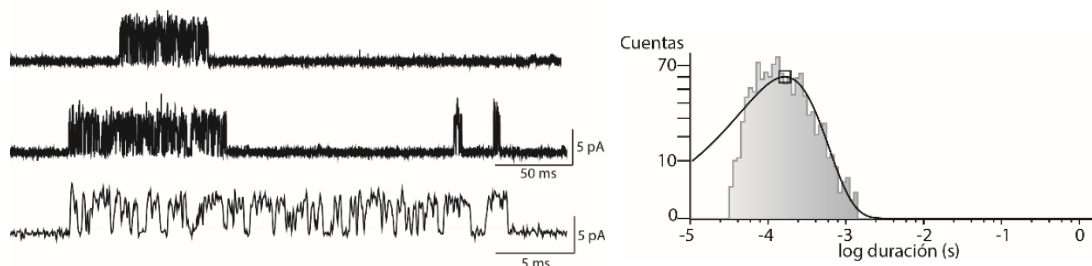


Figura 22. Registros de canal único activados por 5-HT. Izquierda: trazos representativos de la actividad de canal único en presencia de 100 μM de 5-HT en células musculares de larva L1 aisladas de la cepa salvaje PD4251, a dos escalas temporales diferentes. Las aperturas del canal se muestran

como deflexiones hacia arriba. Potencial de pipeta: 100 mV. Derecha: histogramas representativos del tiempo de estado abierto del canal.

A pesar de esto, para confirmar que los canales registrados corresponden realmente a canales activados por 5-HT se realizaron registros de canal único en células embrionarias en presencia de solución de pipeta sin serotonina; y además en células embrionarias obtenidas a partir de la cepa mutante MT9668. Esta cepa carece de la subunidad MOD-1 y por lo tanto no posee receptores MOD-1. No se detectó actividad de canal único en estas condiciones, lo que nos permitiría sugerir que las corrientes unitarias aquí caracterizadas podrían ser respuesta de la actividad del receptor MOD-1 en células embrionarias de *C. elegans*.

Dada las limitaciones del uso de células de *C. elegans* para detectar respuestas macroscópicas y de canal único, se decidió utilizar la expresión heteróloga de MOD-1 en células de mamífero.

Estudios electrofisiológicos de MOD-1 expresado en forma heteróloga en células de mamífero

Para descifrar las propiedades de activación y desensibilización de MOD-1, en primer lugar, el ADNc del receptor MOD-1, cedido por el laboratorio del Dr. H. Robert Horvitz, fue subclonado en el vector pCDNA3.1 de expresión en células BOSC-23 tal como se describió en Metodología. Luego se expresó la subunidad de MOD-1 en células BOSC-23 mediante el método de transfección por precipitación con fosfato de calcio, descrito en metodología, y se midieron las corrientes macroscópicas provocadas por la aplicación rápida de 5-HT a un potencial de pipeta de -50 mV (Figura 23).

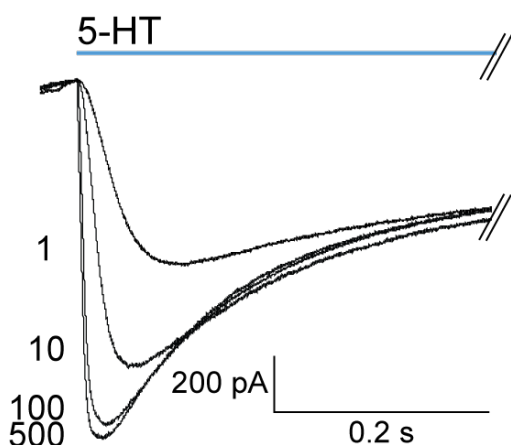


Figura 23. Corrientes macroscópicas de MOD-1 evocadas por 5-HT en células BOSC23. Corrientes típicas obtenidas en la configuración de whole-cell provocadas por la aplicación rápida de 5-HT en las concentraciones indicadas (μM). Potencial de pipeta: -50 mV . Cada corriente corresponde a la corriente promedio de tres aplicaciones de 5-HT a una concentración dada en la misma célula.

Con este sistema, se logró la obtención sistemática de corrientes activadas por 5-HT de muy buena amplitud. Por tal motivo, este trabajo de Tesis se enfocó en la caracterización de la actividad de MOD-1.

Para determinar la potencia de 5-HT, se construyeron curvas de concentración-respuesta midiendo a diferentes concentraciones de agonista las corrientes máximas, que se normalizaron a las provocadas por una concentración de saturación de 5-HT ($100\text{ }\mu\text{M}$) en la misma célula (Figura 24). La EC_{50} resultante para 5-HT fue de $0,96 \pm 0,40\text{ }\mu\text{M}$, que es similar a la de los receptores 5-HT_{3A} humanos y de ratón (Corradi y Bouzat, 2014).

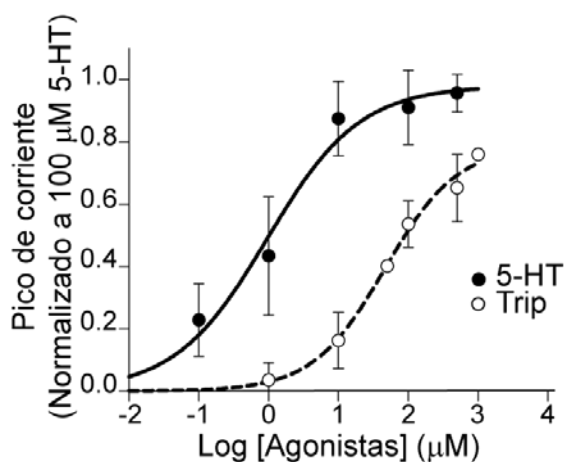


Figura 24. Curvas de concentración-respuesta para 5-HT y Triptamina. Los valores corresponden a la corriente máxima relativa a la provocada por $100\text{ }\mu\text{M}$ de 5-HT en la misma célula. Cada punto se muestra como la media \pm DE ($n = 3$). 5-HT, serotonina; Trip, triptamina.

A una concentración de saturación de 5-HT (100 μ M), el tiempo para alcanzar la máxima amplitud, medido por $t_{10-90\%}$, fue de $12,4 \pm 4,1$ ms ($n = 10$), que es similar al de los receptores 5-HT_{3A} humanos y de ratón (Rodríguez Araujo et al., 2020). Los decaimientos de las corrientes se ajustaron mediante dos componentes exponenciales, con constantes de tiempo de 132 ± 1 ms (área $0,70 \pm 0,09$) y 1067 ± 290 ms (área $0,30 \pm 0,15$) ($n=5$).

Para seguir explorando la cinética de MOD-1, se midió el curso temporal de la recuperación de la desensibilización utilizando un procedimiento de doble pulso. Después de un pulso de 3,5 s de 5-HT (100 μ M) que permitió la desensibilización completa, se aplicó un pulso de ECS libre de agonista de duración variable en intervalos de 200 ms, y finalmente se aplicó un segundo pulso de agonista. La recuperación fraccional se determinó como la relación entre el pico de corriente provocado por el segundo pulso de 5-HT con respecto al primero para cada célula y los valores de las fracciones de recuperación se promediaron para diferentes células. El gráfico del porcentaje de recuperación frente a la duración del interpulso sin agonista se ajustó mediante una exponencial única con una constante de tiempo para la recuperación de $1,10 \pm 0,007$ s ($n=4$). Este valor indica que MOD-1 se recupera ligeramente más rápido de la desensibilización que el receptor 5-HT_{3A} de mamífero (~ 4 s, (Corradi et al., 2009)) (Figura 25).

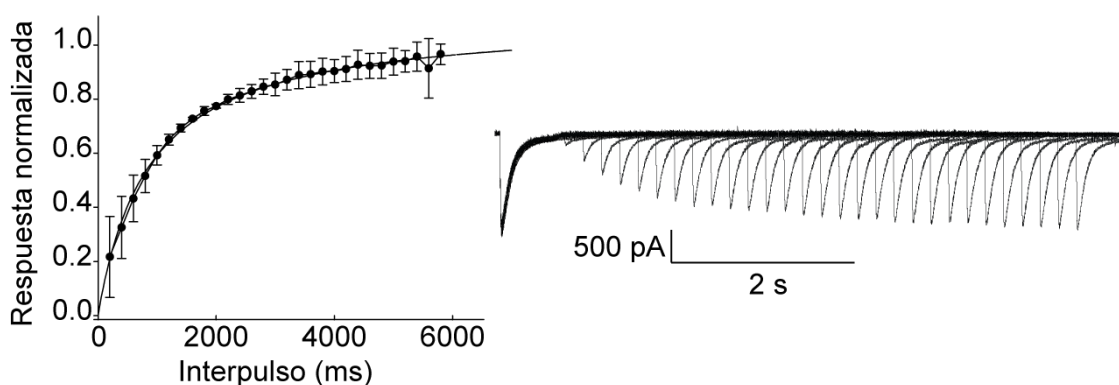


Figura 25. Recuperación de la desensibilización en función del tiempo de incubación en ausencia de 5-HT. Izquierda: Cada punto corresponde a la corriente máxima provocada en el segundo pulso de 5-HT en relación con la provocada por el primer pulso agonista ($n = 4$). Derecha: Experimento típico que muestra la recuperación del pico de corriente original en función del tiempo sin agonista. Potencial de pipeta: -50 mV.

Para caracterizar aún más la activación de MOD-1, se construyeron curvas de corriente-voltaje midiendo la corriente máxima provocada por $1 \mu\text{M}$ de 5-HT en función del potencial de retención. La magnitud de las corrientes de MOD-1 aumentó linealmente con el voltaje en los potenciales de mantenimiento positivo y negativo, lo que indica un comportamiento óhmico y poca rectificación (Figura 26).

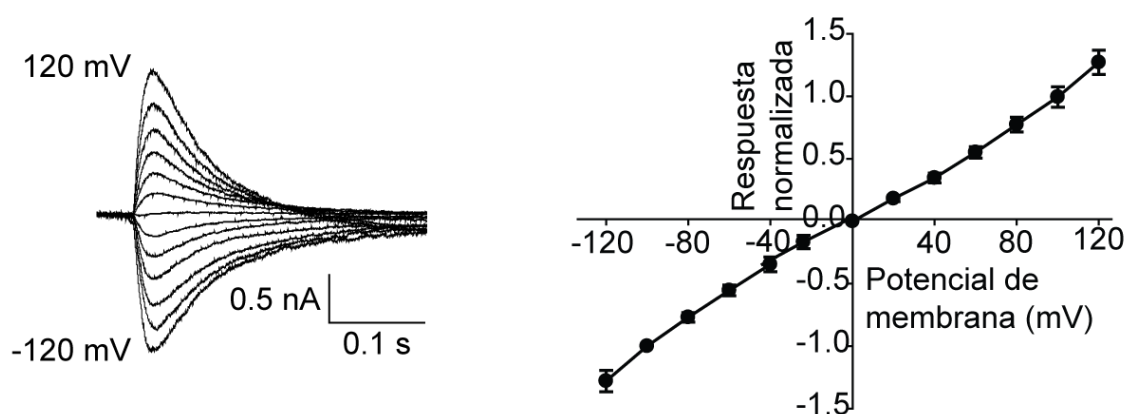


Figura 26. Curva corriente-voltaje de MOD-1. Izquierda: Corrientes macroscópicas típicas de MOD-1 evocadas por $1 \mu\text{M}$ de 5-HT a diferentes potenciales de pipeta. Derecha: Relaciones corriente-voltaje obtenidas a partir de los valores de la corriente máxima en relación con la provocada a un potencial de pipeta de -100 mV para cada célula. Los puntos corresponden a la media \pm DE ($n = 3$). Los datos fueron ajustados por regresión lineal.

Buscando activadores de MOD-1

Aprovechando la caracterización de las respuestas macroscópicas de MOD-1, se decidió utilizar este sistema para buscar nuevos ligandos de MOD-1.

Primero se exploró cómo los agonistas de los receptores 5-HT₃ de vertebrados activan MOD-1. La triptamina es un agonista ortostérico de baja eficacia de los receptores 5-HT_{3A} humano y de ratón, tal como se describe en el Capítulo 1 de esta Tesis (Corradi y Bouzat, 2014; Rodríguez Araujo et al., 2020). La curva concentración-respuesta para la triptamina sobre células expresando MOD-1 reveló un valor de EC₅₀ de $46,6 \pm 11,0 \mu\text{M}$ y una eficacia de $\sim 80\%$ (α). Este resultado indica que la triptamina es

notablemente más eficaz para MOD-1 que para los receptores 5-HT_{3A} humanos ($EC_{50} = 190 \mu\text{M}$ y $\alpha = 27 \%$) o de ratón ($EC_{50} = 40 \mu\text{M}$ y $\alpha = 22 \%$) (Corradi y Bouzat, 2014; Rodriguez Araujo et al., 2020) (Figura 24 y 27).

También se evaluó la acción de 2-Me-5HT, que provoca respuestas parciales en los receptores 5-HT_{3A} de ratón ($EC_{50} = 5,2 \mu\text{M}$ y $\alpha = 60 \%$; (Corradi y Bouzat, 2014)). La aplicación de $50 \mu\text{M}$ de 2-Me-5HT ($n=3$) no mostró respuestas detectables. El aumento de la concentración a $100 \mu\text{M}$ ($n=3$), $250 \mu\text{M}$ ($n=6$) y $500 \mu\text{M}$ ($n=6$) dio como resultado respuestas muy pequeñas, lo que indica que 2-Me-5HT tiene una capacidad extremadamente baja para activar MOD-1 (Figura 27).

Por lo tanto, se demostró que, aunque MOD-1 y 5-HT_{3A} muestran una sensibilidad similar para 5-HT, responden de manera diferente a otros agonistas ortostéricos del receptor 5-HT₃.

Los terpenoides, como el timol, son agonistas alostéricos de los receptores 5-HT_{3A}; provocan la activación al unirse a una cavidad transmembrana en el receptor tal como se describe en el Capítulo 1 de esta Tesis (Lansdell et al., 2015; Rodriguez Araujo et al., 2020). Se encontró que el timol, a las concentraciones en las que es activo en los receptores 5-HT_{3A}, no produjo ninguna respuesta significativa ($5 \mu\text{M}$ ($n=3$), $50 \mu\text{M}$ ($n=6$), $100 \mu\text{M}$ ($n=3$)), lo que indica que no es un agonista alostérico de MOD-1 (Figura 27).

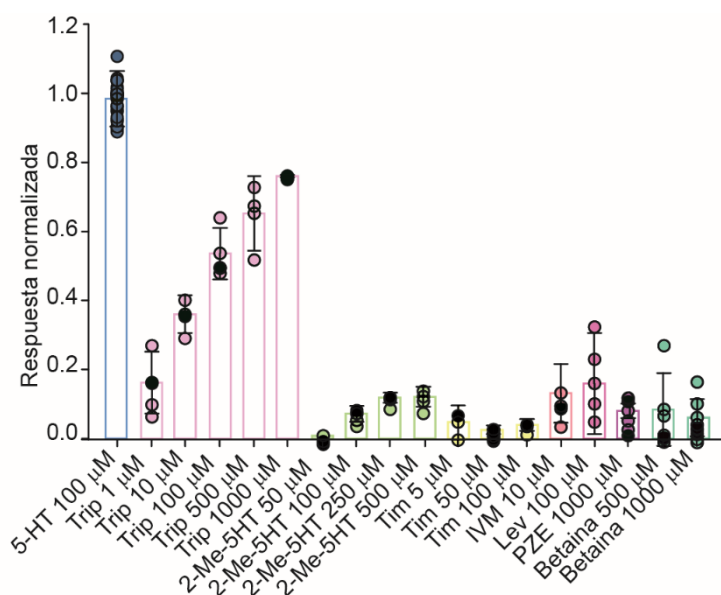


Figura 27. Búsqueda de activadores de MOD-1. Gráfico que muestra las corrientes máximas provocadas por diferentes ligandos con respecto a las provocadas por una concentración de saturación de 5-HT (100 μ M). Trip: triptamina, 1 μ M (n = 4), 10 μ M (n = 3), 100 μ M (n = 4), 500 μ M (n = 3), 1000 μ M (n = 3); 2-Me-5HT: 2-metil-5-hidroxitriptamina, 50 μ M (n = 3), 100 μ M (n = 3), 250 μ M (n = 6), 500 μ M (n = 6) Tim: timol, 5 μ M (n = 3), 50 μ M (n = 6), 100 μ M (n = 3); IVM: ivermectina, 10 μ M (n = 5); Lev: levamisol, 100 μ M (n = 4); PZE: piperazina, 1000 μ M (n = 5); betaína, 500 μ M (n = 6), 1000 μ M (n = 9). Los puntos de datos individuales para cada condición se muestran con la barra de color que indica la media \pm DE.

También se evaluó si MOD-1 puede ser activado por fármacos antihelmínticos clásicos que actúan a través de los receptores *Cys-loop*, incluidos ivermectina, levamisol y piperazina, que son agonistas de los receptores GluCl, L-AChR y UNC-49, respectivamente (Accardi et al., 2012; Hernando et al., 2012, 2019; Hernando y Bouzat, 2014; Lynagh y Lynch, 2012), así como betaína, que activa los receptores ACR-23 y DEG-3/DES-2 de *C. elegans* y posee actividad nematocida (Blunden, 2003; Hansen et al., 2022; Jenkins et al., 1998; Peden et al., 2013; Rufener et al., 2013). Se utilizaron concentraciones que se han aplicado para la activación de sus receptores diana canónicos. Para 10 μ M de IVM (n=5), 100 μ M de levamisol (n=4), 1 mM de piperazina (n=5), 500 y 1000 μ M de betaína (n=6 y n=9) las respuestas fueron insignificantes, lo que indica que estos fármacos no activan MOD-1 (Figura 27). En el caso de IVM, también se verificó que las corrientes de MOD-1 no se producían si el fármaco se aplicaba durante 2 min (10 μ M de IVM; n = 5), ya que se ha demostrado que IVM produce una activación lenta del receptor GluCl (Degani-Katzav et al., 2016).

Modulación farmacológica del receptor MOD-1

Para contribuir a la comprensión del papel de este receptor en los gusanos y al desarrollo de nuevos fármacos antihelmínticos, se exploraron compuestos que puedan actuar como moduladores de MOD-1.

Para evaluar la modulación de MOD-1, primero se siguió el protocolo de preincubación en el que la célula se expuso al compuesto antes de la aplicación de 5-HT. Se aplicó a la célula un pulso de ECS que contenía 1 μM de 5-HT (corriente de control), luego se expuso la célula durante 30-120 s a ECS que contenía el compuesto en estudio y, finalmente, se aplicó un segundo pulso de ECS que contenía 1 μM de 5-HT (corriente tratada) (Figura 28). Los cambios en la carga neta y la amplitud de la segunda corriente con respecto a la original se promediaron entre diferentes células.

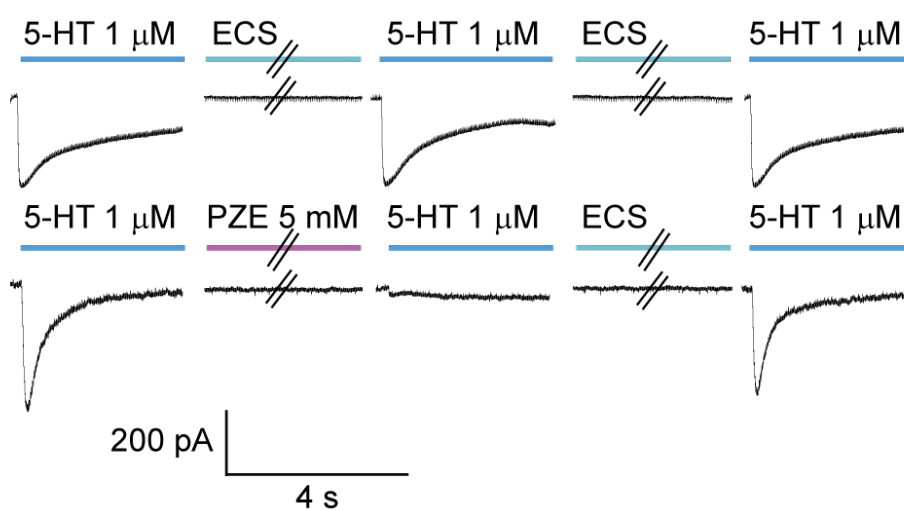


Figura 28. Modulación de corrientes de MOD-1 por preincubación con diferentes compuestos. Ejemplo ilustrativo del protocolo utilizado para determinar los efectos de la preincubación del fármaco en las corrientes provocadas por 5-HT (protocolo de preincubación). Potencial de pipeta: -50 mV . Se aplicaron pulsos de 3,5 s de 1 μM de 5-HT antes y después de la preincubación durante 30 s con ECS (control) o el fármaco en estudio. Las corrientes se registraron después de 30 s de lavado con ECS para confirmar la recuperación. Este protocolo se repitió tres veces en cada célula.

Timol a 5 μM ($n=3$), 50 μM ($n=3$) y 100 μM ($n=3$), ivermectina a 10 μM ($n=11$) y betaína a 1 mM ($n=8$), 5 mM ($n=3$) y 10 mM ($n=3$) no tuvieron ningún efecto significativo sobre las corrientes provocadas por 5-HT. Curiosamente, la exposición previa de la célula a 1 mM de piperazina condujo a una disminución profunda de la corriente máxima (69,2 %, $P < 0,001$) y la carga neta (66,3 %, $P < 0,001$, $n = 12$) (Figura 29).

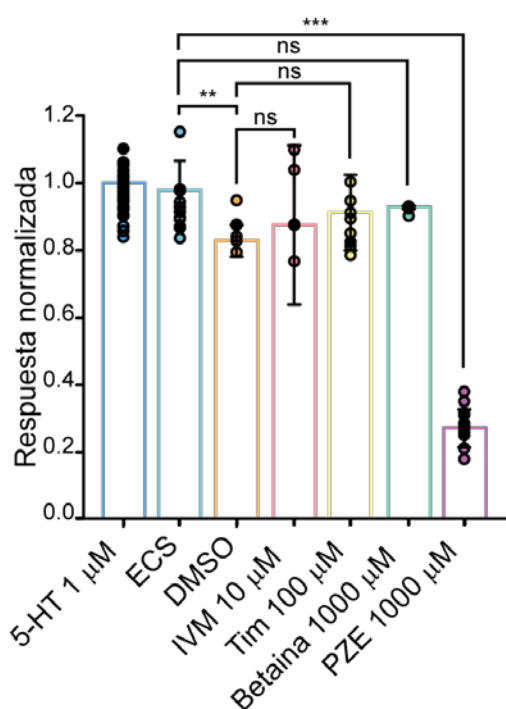


Figura 29. Gráfico de barras que muestra el efecto de la preincubación con diferentes compuestos en las concentraciones indicadas sobre las corrientes evocadas por 5-HT. Los puntos de datos individuales para cada condición se muestran con la barra de color que indica la media \pm DE. Prueba t de Student, valores de p para IVM: ivermectina (10 μM , $n = 11$, $P = 0,675$); Tim: timol (100 μM , $n = 3$, $p = 0,183$); betaína (1 mM, $n = 8$, $p = 0,48$); PZE: piperazina (1 mM, $n = 12$). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y ns: estadísticamente no significativo.

Para caracterizar aún más la acción de la PZE como un nuevo inhibidor de MOD-1, se construyeron curvas de concentración-respuesta para determinar el valor IC_{50} para corrientes activadas por 1 μM de 5-HT y preincubadas durante 30 s con PZE (Figura 30). Se encontró que la PZE inhibe las corrientes de MOD-1 con un IC_{50} de $113 \pm 29 \mu\text{M}$.

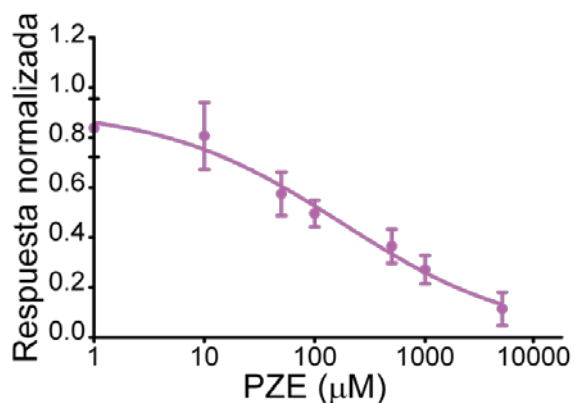


Figura 30. Curva de concentración-respuesta que muestra la inhibición por PZE de las corrientes evocadas por 5-HT del receptor MOD-1. La curva se ajustó mediante una función logística utilizando Sigma Plot. Cada punto corresponde a la corriente normalizada a una concentración dada de al menos tres experimentos diferentes.

Dado el profundo efecto de PZE, se determinó si también afecta las corrientes de MOD-1 cuando se aplica junto con 5-HT (protocolo de co-aplicación). En cada célula, se aplicaron tres pulsos de ECS que contenía 1 μM de 5-HT y luego tres pulsos de ECS que contenían 1 μM de 5-HT y 1 mM de PZE. La PZE no produjo cambios estadísticamente significativos en los picos de corrientes ($0,91 \pm 0,09$, $p = 0,617$) ni en la carga neta ($0,93 \pm 0,19$, $p = 0,669$, $n=5$) (Figura 31). Así, en contraste con los importantes efectos observados con la preincubación, la co-aplicación de PZE con 5-HT no inhibe las corrientes de MOD-1.

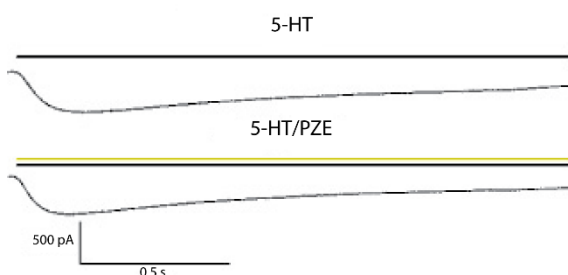


Figura 31. Protocolo de co-aplicación. Arriba: pulsos de 1 μM de 5-HT durante 3,5 s aplicados solos (corriente control). Abajo: pulsos de 1 μM de 5-HT junto con 1 mM de PZE (corriente tratada). Potencial de pipeta: -50 mV.

Dado que la PZE es un ligando GABAérgico y MOD-1 muestra una identidad del 28 % con los receptores Cel-UNC-49 GABA_A, también se evaluó, mediante el protocolo de preincubación, los efectos del muscimol -un isoxazol psicoactivo de *Amanita muscaria* y hongos relacionados- y la isoguvacina, que son agonistas selectivos de GABA_A (Johnston, 2014). Se encontró que ambos fármacos no pudieron activar MOD-1, pero produjeron inhibición de las corrientes de MOD-1 cuando fueron preincubados. A 1 mM, la isoguvacina redujo las corrientes máximas 33 ± 10 % ($n=10$) y el muscimol, 85 ± 10 %

(n=5). La isoguvacina parecía ser un antagonista muy débil ya que la reducción de la corriente máxima se mantuvo en aproximadamente un 30 % a concentraciones superiores a 0,6 mM.

Para caracterizar la acción del muscimol como un nuevo inhibidor de MOD-1, se construyeron curvas de concentración-respuesta para determinar el valor IC_{50} para corrientes activadas por 1 μ M de 5-HT y preincubadas durante 120 s con muscimol. Se encontró que el muscimol inhibe las corrientes de MOD-1 con un IC_{50} de $249 \pm 160 \mu$ M, lo que indicó una potencia más baja que la PZE (Figura 32).

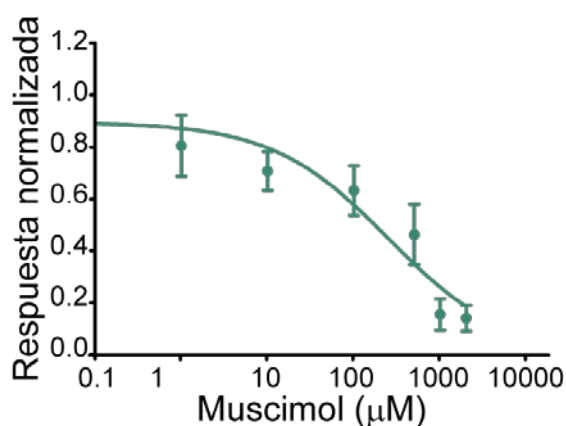


Figura 32. Curva de concentración-respuesta que muestra la inhibición por muscimol de las corrientes evocadas por 5-HT del receptor MOD-1. La curva se ajustó mediante una función logística utilizando Sigma Plot. Cada punto corresponde a la corriente normalizada a una concentración dada de al menos tres experimentos diferentes.

La inhibición de las corrientes de 5-HT por los ligandos GABAérgicos podría deberse a sus acciones como antagonistas competitivos o no competitivos. El hecho de que la PZE ejerce una mayor reducción de corrientes si se preincuba y no si se co-aplica con 5-HT sugiere que la inhibición no es competitiva y revela un nuevo blanco farmacológico y mecanismo para este antiparasitario. Para confirmar aún más esto, se realizaron experimentos en los que la concentración de PZE durante la preincubación permaneció constante, pero la concentración de 5-HT aumentó 10 y 50 veces. La justificación de este experimento fue que si la PZE compitiera con la 5-HT, el aumento de la concentración de 5-HT reduciría su efecto. La figura 33 muestra que la disminución de la corriente máxima debido a la preincubación con 0,5 mM de PZE fue independiente de la concentración de agonista (1, 10 o 100 μ M de 5-HT), lo que sugiere una inhibición no competitiva. Como se describe para la PZE, el porcentaje de reducción actual no

cambió significativamente con la concentración de 5-HT (1 o 100 μ M) para 1 mM de isoguvacina o 0,1 mM de muscimol, lo que indica un mecanismo similar de antagonismo no competitivo (Figura 33).

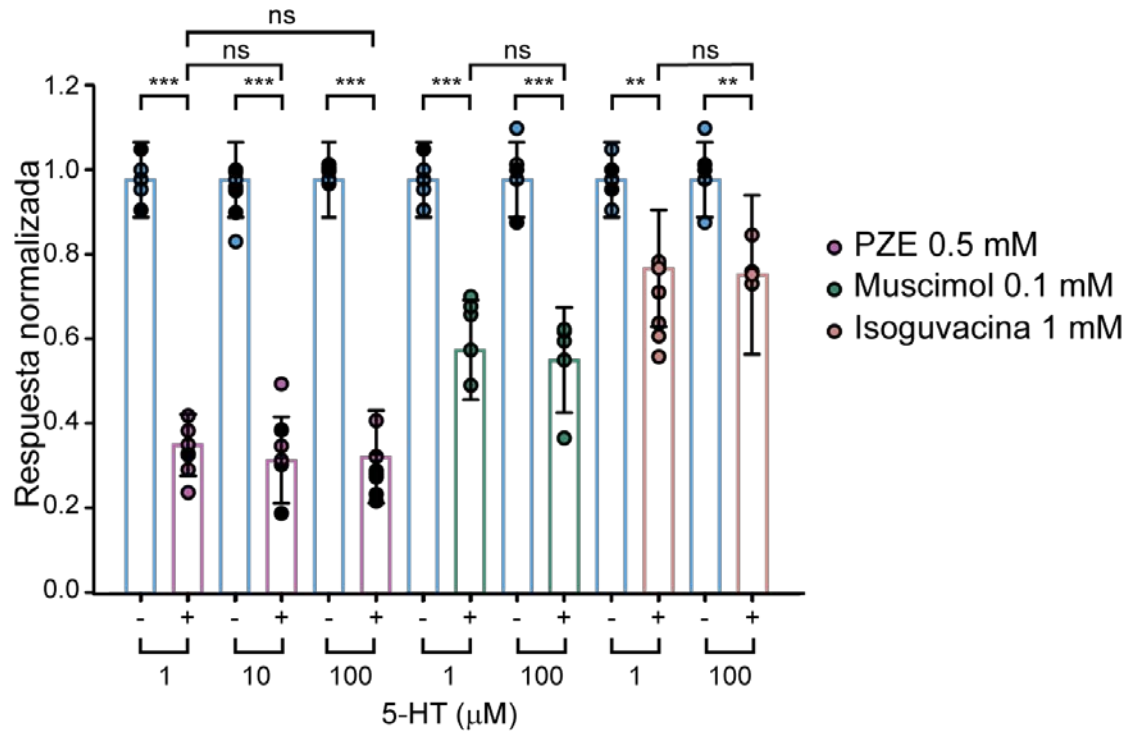


Figura 33. Efectos de 0,5 mM de PZE ($n = 6$, $p = 1$), 0,1 mM de muscimol ($n = 6$, $p = 1$), y 1 mM de isoguvacina ($n = 6$, $p = 1$) en las corrientes máximas provocadas por diferentes concentraciones de 5-HT. Los puntos de datos individuales para cada condición se muestran con la barra de color que indica la media \pm DE. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA con la prueba t de Bonferroni. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y ns: no estadísticamente significativo.

Efectos de la modulación de MOD-1 en el comportamiento del gusano

Para relacionar los efectos moleculares de los ligandos de MOD-1 con las acciones conductuales, se realizaron ensayos de actividad locomotora en *C. elegans*. Todos los ensayos automáticos se llevaron a cabo en paralelo con los experimentos de control y

los efectos principales se confirmaron mediante inspección visual utilizando el método de ensayo de movilidad en medio líquido como se describe en Metodología.

Primero se exploró cómo la exposición a 5-HT exógena afecta a todo el organismo. Para ello, se evaluó la respuesta de los gusanos adultos jóvenes de tipo salvaje a la exposición con 5-HT en función del tiempo y la concentración (0,05-4 mM en agua) (Figura 34). Se descubrió que 1 mM de 5-HT en agua producía una disminución rápida y reversible de la motilidad de los gusanos de tipo salvaje. La reducción de la motilidad alcanzó su nivel máximo, que fue de alrededor del 50 %, después de 15 min de exposición al fármaco (Figura 34, $p < 0,001$). Sin embargo, los gusanos de tipo salvaje se recuperaron gradualmente de este estado de reposo después de 20 minutos de exposición a 5-HT en concentraciones por debajo de 1 mM. Después de 60 min, la motilidad del gusano estaba cerca de sus niveles basales (~ 90 % de recuperación) incluso en presencia continua de 1 mM de 5-HT en la mayoría de los ensayos (Figura 34).

En cambio, a concentraciones de 5-HT superiores a 1 mM, los gusanos no se recuperaron de la parálisis al menos durante los primeros 120 min.

La cepa mutante *mod-1 (ok103)*, que carece de MOD-1, fue parcialmente resistente a 1 mM de 5-HT, ya que la motilidad se redujo solo alrededor de un 10-20 %, lo que indica que MOD-1 es un blanco para la inhibición de la motilidad mediada por 5-HT (Figura 34). La diferencia de inhibición entre los gusanos de tipo salvaje y mutantes después de una exposición de 15 min a 1 mM de 5-HT fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$), confirmando la contribución de MOD-1 a este proceso (Figura 34).

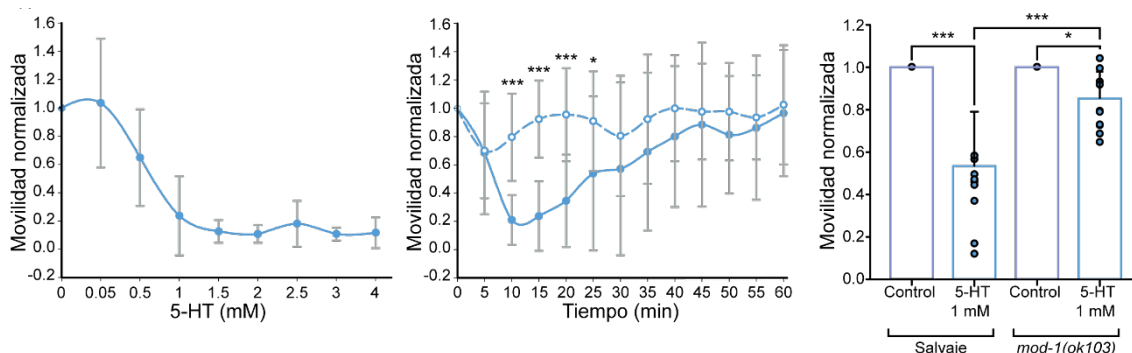


Figura 34. Reducción de la movilidad de los gusanos en función de la concentración de 5-HT y el tiempo. Los gusanos salvajes adultos jóvenes sincronizados se colocaron en placas de

multiwells de 96 pocillos (alrededor de 50 gusanos por pocillo) que contenían 5-HT y la motilidad se registró usando el WMicroTracker en intervalos de 5 minutos durante 120 minutos, se muestran los primeros 60 minutos. Izquierda: la curva de concentración-respuesta se construyó midiendo la reducción de la motilidad a los 15 minutos de exposición a las concentraciones de 5-HT indicadas. El experimento representativo que se muestra corresponde a la media \pm DE de 12 pocillos para cada condición (con unos 50 gusanos por pocillo) ejecutados en paralelo. Medio: la motilidad se registró en función del tiempo para gusanos sincronizados de tipo salvaje (línea completa) y mod-1 (ok103) (línea discontinua) en ausencia (tiempo 0, 100% de movilidad) o presencia de 1 mM de 5-HT. La curva corresponde al promedio de 11 experimentos independientes, cada uno con 12 pocillos por condición ejecutados en paralelo. Derecha: gráfico de barras que muestra la reducción de la movilidad de los gusanos en 1 mM de 5-HT a los 15 min de exposición para gusanos de tipo salvaje y mod-1 (ok103) ($n = 11$ experimentos independientes). Los resultados se muestran como la media \pm DE. Se usaron alrededor de 50 gusanos por pocillo y un mínimo de 12 pocillos para cada condición en cada experimento independiente. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA con la prueba t de Bonferroni. Los valores de p fueron $*** p < 0,001$ y $*p = 0,026$.

Los gusanos mutantes también se recuperaron con el tiempo, lo que indica que la reversibilidad del efecto de 5-HT no dependía solo de MOD-1. Además, a concentraciones más altas de 5-HT (> 2 mM), los gusanos mutantes MOD-1 quedaron completamente paralizados como los gusanos de tipo salvaje.

También se exploró cómo la triptamina afecta la motilidad de *C. elegans* de adultos jóvenes como se describe para 5-HT. Se observó una clara reducción de la motilidad del gusano después de la exposición a 5 mM de triptamina. El efecto principal se logró después de 15 min, momento en el que se produjo una reducción estadísticamente significativa de la motilidad de los gusanos ($> 70\%$, $p < 0,001$) (Figura 35). La disminución de la actividad en presencia continua de 5 mM de triptamina fue más pronunciada para los gusanos de tipo salvaje que para los gusanos *mod-1* (ok103) ($\sim 72\%$ y $\sim 50\%$, respectivamente; $p = 0,006$). Por lo tanto, como se muestra para 5-HT, MOD-1 está parcialmente involucrado en el efecto paralizante de triptamina. A diferencia de la 5-HT, los gusanos no recuperaron los valores de actividad basal durante 120 minutos de exposición (Figura 35).

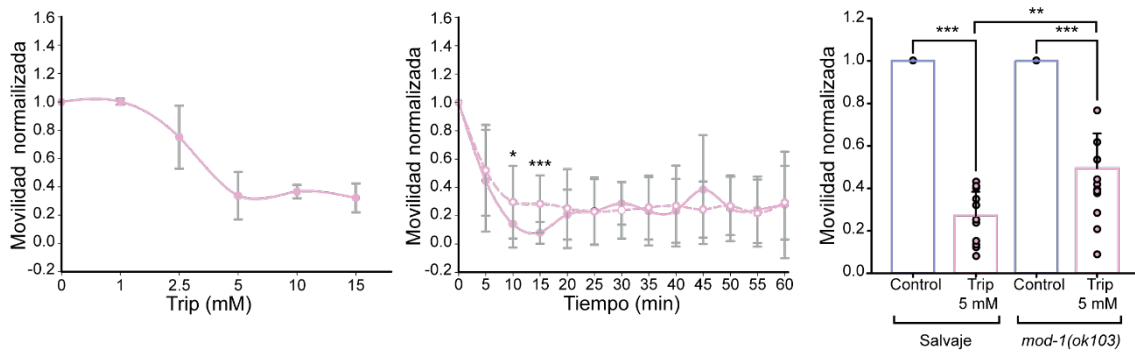


Figura 35. Reducción de la movilidad de los gusanos en función de la concentración de Trip y el tiempo. Los experimentos se realizaron como se describe para 5-HT (Figura 34). La curva representativa de concentración-respuesta corresponde a la media \pm DE de 12 pocillos para cada condición con alrededor de 50 gusanos por pocillo. Los gráficos de la derecha muestran los puntos de datos individuales para cada experimento con la barra de color que indica la media \pm DE. Cada punto individual corresponde a uno de los 13 experimentos independientes, cada uno de 12 pocillos (50 gusanos por pocillos) por condición. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA con la prueba *t* de Bonferroni. Los valores de *p* para *n* = 13 experimentos independientes fueron *** *p* < 0,001; ** *p* = 0,006.

Luego de evaluar las acciones de agonistas de MOD-1 sobre el comportamiento del gusano, se decidió explorar si la acción inhibitoria de la PZE sobre el receptor MOD-1 demostrada en los experimentos electrofisiológicos afecta el comportamiento del gusano. El primer paso fue diseccionar este efecto de su acción agonista sobre el receptor muscular UNC-49 (GABA_A) que conduce a la parálisis flácida. Por lo tanto, se probó las concentraciones de PZE en las que no se produjo parálisis flácida como lo revelaron los ensayos de actividad automática y los ensayos de *thrashing rate*. No se observaron cambios en la motilidad con 5 mM de PZE después de 15 minutos de exposición, mientras que con 10 mM de PZE la parálisis comenzó a ser evidente. Informes anteriores han demostrado que se necesitan altas concentraciones de PZE para producir un efecto antihelmíntico, posiblemente debido a limitaciones de su absorción (Hernando y Bouzat, 2014).

La combinación de 1 mM de 5-HT, que activa MOD-1, con 5 mM de PZE, que inhibe MOD-1, produjo una inhibición de la motilidad menor que la producida por 1 mM de 5-HT solo, lo que indica que PZE previene la parálisis inducida por 5-HT (Figura 36). Por lo tanto, estos experimentos confirman que la inhibición de PZE de MOD-1 tiene un impacto fisiológico en los gusanos.

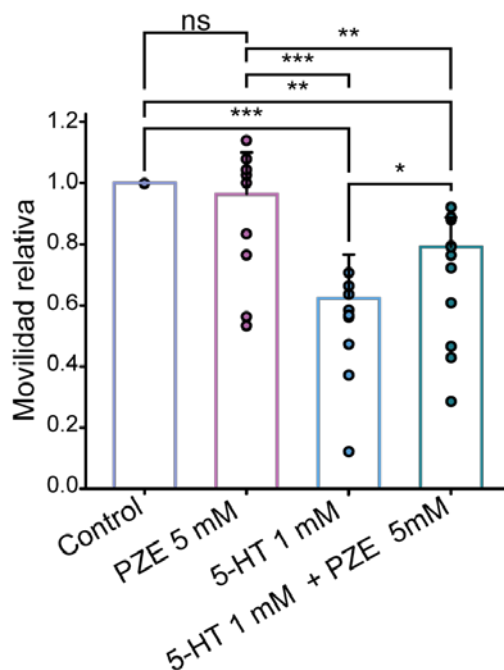


Figura 36. Efectos farmacológicos de PZE actuando a través de MOD-1. Gráfico que muestra el cambio en la motilidad después de 15 minutos de exposición a 5-HT, PZE y 5-HT junto con PZE en gusanos salvajes. El control corresponde al movimiento basal de los gusanos en ausencia de fármacos. Los puntos de datos individuales para cada condición se muestran con la barra de color que indica la media \pm DE para 9 ensayos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA con la prueba *t* de Bonferroni. Los valores de *p* de izquierda a derecha fueron: *** $p < 0,001$; ** $p = 0,002$; *** $p < 0,001$; ** $p = 0,009$; * $p = 0,027$ y ns: no estadísticamente significativo.

Todos los ensayos automáticos se confirmaron mediante inspección visual utilizando el método de ensayo de movilidad en medio líquido. Para ello se partió de una población de nematodos adultos jóvenes sincronizados, y se llevaron a cabo los ensayos a temperatura ambiente. Los gusanos fueron colocados en cada pocillo de placas *multiwells* conteniendo agua en la condición control o junto con las drogas en la

condición tratada. Se esperó 30 minutos para que los nematodos se estabilicen en el medio líquido, y se contaron los cambios en la dirección de curvatura del cuerpo del nematodo por minuto (*thrashes/min*) de cada nematodo bajo la lupa (Figura 37).

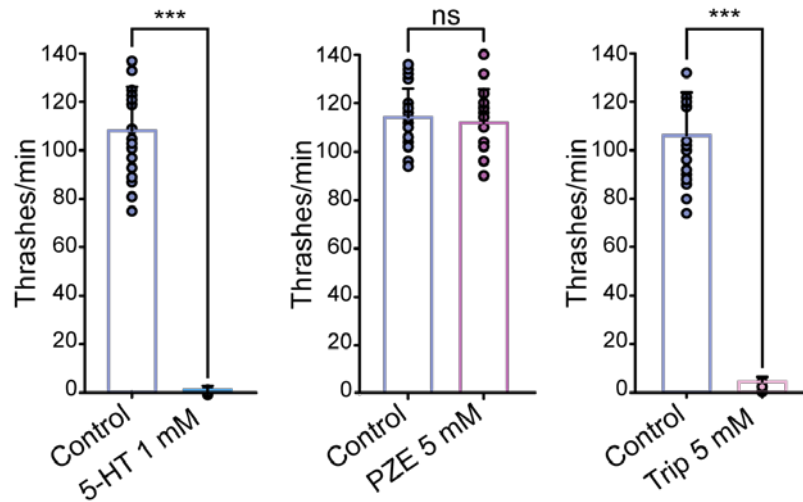


Figura 37. Efectos de 5-HT, trip y PZE en el nado de nematodos medido como thrashes por minuto para gusanos de tipo salvaje. Los gusanos sincronizados se colocaron en pocillos individuales que contenían 100 μ l de H₂O con o sin fármaco a temperatura ambiente en una placa multiwells de 96 pocillos. Después de 15 minutos, el número de thrashes (curvaturas del cuerpo de un lado al otro) se contaron durante 1 min. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces independientes ($n > 15$ gusanos fueron analizados por condición en cada experimento). Los puntos individuales para cada condición se muestran con la barra de color que indica la media \pm DE. Prueba t de Student. Los valores p fueron: *** $p < 0,001$; ns: no estadísticamente significativo ($p = 0,723$).

DISCUSIÓN

El receptor MOD-1 de *C. elegans* es un canal pentamérico de cloruro activado por serotonina que pertenece a la familia de receptores *Cys-loop*, pero es exclusivo de los nematodos. Muestra un $\sim 80\%$ de similitud con MOD-1 de *Haemonchus contortus* (Hco-MOD-1; (Beech et al., 2013)) y un $\sim 46\%$ con el MOD-1 del nematodo fitoparásito *Globodera pallida* (Gpa-MOD-1; (Crisford et al., 2020)). La alta conservación de MOD-1 dentro del filo Nematoda lo convierte en un nuevo objetivo antihelmíntico prometedor debido a su ventaja de estar restringido a nematodos ya que un fármaco dirigido a este receptor no tendría efectos nocivos en el huésped ni en el medio ambiente al no afectar a especies de invertebrados beneficiosas. Además, refuerza el uso de *C. elegans* como modelo en el descubrimiento de fármacos antihelmínticos.

El establecimiento de un nuevo objetivo farmacológico requiere el conocimiento de su farmacología y función a nivel molecular. Con esto en mente, se intentó identificar corrientes macroscópicas y unitarias en cultivos aislados de células embrionarias y larvales de *C. elegans*. Se encontró una gran dificultad utilizando tanto registros de corrientes macroscópicas como de canal único. Se demostró la existencia de canales iónicos funcionales que responden a 5-HT. Tenemos evidencias experimentales que apoyan que las repuestas corresponden a MOD-1 dado que se detectaron corrientes macroscópicas tanto en células musculares como neuronales, hecho que coincide con la expresión de MOD-1; y que no se observan los canales únicos en ausencia de 5-HT en la solución de pipeta o en células obtenidas del mutante que carece de MOD-1. Sin embargo, dado la complejidad de las técnicas de cultivo, el bajo porcentaje de sellos con actividad (6%), y la existencia de otros receptores en *C. elegans* que son activados por serotonina, como LGC-50, se decidió abordar el estudio de este receptor mediante expresión heteróloga en células de mamíferos. Para ello, se subclonó el cDNA de MOD-1 en un vector de expresión para células de mamífero, y se logró exitosamente la expresión funcional de MOD-1 en células BOSC-23.

Tomando ventaja de este sistema, se caracterizó sus propiedades de activación y se realizó un examen farmacológico para identificar nuevos ligandos de MOD-1 utilizando registros de corrientes macroscópicas. Se encontró que MOD-1 se expresó bien y funcionó como un receptor homomérico, tal como se describió antes en la primera caracterización (Ranganathan et al., 2000).

Los registros macroscópicos mostraron que las respuestas de MOD-1 fueron provocadas rápidamente por 5-HT, de manera similar a los receptores 5-HT_{3A} de vertebrados, decayeron en presencia del agonista debido a la desensibilización y se recuperaron relativamente rápido de la desensibilización en ausencia del agonista. Las corrientes tuvieron amplitudes similares en potenciales de membrana positivos y negativos, lo que indica que no hubo una rectificación significativa.

Los receptores 5-HT₃ y MOD-1 han evolucionado a partir de un gen ancestral común y responden a 5-HT, pero MOD-1 está ausente en los vertebrados (Dent, 2006). La EC₅₀ determinada a partir de las corrientes máximas en función de la concentración de 5-HT fue del mismo orden que la de los receptores 5-HT_{3A} de los vertebrados (Corradi y Bouzat, 2014). Sin embargo, MOD-1 respondió de manera muy diferente a los agonistas parciales de 5-HT_{3A}. En este sentido, la triptamina fue un agonista significativamente más eficaz y potente de MOD-1 que de 5-HT_{3A} (Corradi y Bouzat, 2014). Por el contrario, 2-Me-5HT, que activa eficazmente los receptores 5-HT_{3A} (Corradi y Bouzat, 2014), no pudo activar MOD-1, lo que reveló una selectividad agonista diferente entre estos dos receptores *Cys-loop* activados por 5-HT. Por lo tanto, aunque comparten 5-HT como su neurotransmisor endógeno, difieren en cómo interactúa en el sitio de unión (Mu et al., 2003).

En los receptores *Cys-loop*, el sitio de unión se encuentra en las interfaces entre las subunidades adyacentes y está compuesto por residuos de los bucles A, B y C en la subunidad principal (+) y los bucles D, E y F de la subunidad complementaria (-) (Basak et al., 2018; Sauguet et al., 2015). Se ha demostrado que los residuos aromáticos conservados de diferentes bucles son importantes para el reconocimiento y activación de agonistas en toda la familia. En la región del sitio de unión del agonista, los receptores 5-HT₃ y MOD-1 son altamente homólogos, siendo MOD-1 45% similar a 5-HT₃ (Mu et al., 2003). Sin embargo, existen diferencias entre los principales residuos aromáticos. Por

ejemplo, el residuo de triptófano conservado en el bucle B de 5-HT₃, que produce una interacción catión- π con 5-HT y otros ligandos importantes para la activación (Basak et al., 2018; Beene et al., 2002; Corradi y Bouzat, 2014; Kesters et al., 2013; Mu et al., 2003), se reemplaza por una tirosina en MOD-1, y una tirosina conservada en el bucle C de 5-HT₃ es un triptófano en MOD-1. Se ha sugerido que la interacción de unión catión- π crítica del bucle B en el receptor 5-HT₃ se trasladó al sitio del bucle C en el receptor MOD-1 (Mu et al., 2003). Por lo tanto, aunque los receptores MOD-1 y 5-HT₃ están diseñados precisamente para unir 5-HT, los diseños son diferentes y responden de manera diferente a diferentes ligandos serotoninérgicos. Recientes estructuras de criomicroscopía electrónica de alta resolución de 5-HT_{3A} de longitud completa en complejo con 5-HT o diferentes setrones, combinados con simulaciones de dinámica molecular revelaron distintas interacciones para los ligandos en el sitio de unión que puede ser la base de sus diversas afinidades (Basak et al., 2018, 2020). Por lo tanto, nuevos estudios estructurales sobre MOD-1 podrían servir para descifrar la base de la selectividad del fármaco. De hecho, las altas concentraciones de granisetron y ondansetron, ambos potentes antagonistas de 5-HT_{3A}, no afectaron la acción de 5-HT sobre MOD-1 expresado en los ovocitos (Ranganathan et al., 2000).

También se demostró que el timol, que es un agonista alostérico de los receptores 5-HT_{3A} tal como se describe en el Capítulo 1 de esta Tesis, no puede activar MOD-1, lo que indica diferentes mecanismos o sitios de ago-PAM entre ambos receptores.

Con el fin de relacionar los hallazgos moleculares con acciones de los compuestos sobre MOD-1 a nivel de organismo completo, se realizaron mediciones de motilidad de gusanos, utilizando tanto el sistema automático que mide la movilidad en función del tiempo como el estudio bajo la lupa en que se cuenta el número de veces que el gusano cambia su curvatura por minuto (*thrashing rate*). Nuestro estudio mostró que la exposición a una concentración baja de 5-HT (1 mM en agua) produjo una parálisis transitoria de la que los gusanos se recuperaron en presencia continua de 5-HT en 60 min en la mayoría de los ensayos. Esta recuperación (hasta donde se sabe) no ha sido reportada en estudios previos (Crisford et al., 2020; Gürel et al., 2012; Ranganathan et al., 2000), probablemente debido a las altas concentraciones de 5-HT utilizadas en los ensayos. De hecho, en nuestros ensayos a concentraciones de 5-HT superiores a 1 mM,

la motilidad del gusano se mantuvo baja después de 120 min. En otros trabajos se ha descrito que los gusanos expuestos a altas concentraciones de 5-HT se recuperaron después de ser trasladados a un entorno libre de 5-HT (Kullyev et al., 2010). También se demostró que los gusanos pueden adaptarse a la estimulación de la puesta de huevos inducida por 5-HT después de una exposición prolongada a altas concentraciones de 5-HT (Schafer y Kenyon, 1995).

La recuperación de la motilidad observada aquí en la presencia continua de 5-HT puede deberse a la recaptación de 5-HT en las terminales neuronales por el transportador de recaptación de serotonina MOD-5; degradación de 5-HT durante el transcurso del ensayo, aunque es poco probable dado que se preparó solución de 5-HT nueva antes de cada ensayo; o desensibilización del receptor y/o adaptación al ambiente de 5-HT. Este efecto novedoso debe considerarse en futuros estudios de señalización de 5-HT.

Se observó que la inhibición de la motilidad por 5-HT fue menos profunda para los mutantes que carecían de MOD-1 que para los gusanos de tipo salvaje. Esto indica una contribución parcial de MOD-1 a la parálisis de 5-HT que, a su vez, es consistente con la presencia de otros tipos de receptores de 5-HT.

Se ha descrito recientemente que la triptamina activa LGC-50 (Morud et al., 2021), pero este fue el primer informe, hasta donde se sabe, que mostró que la triptamina es un activador de MOD-1 de *C. elegans*. Los registros electrofisiológicos mostraron que la triptamina es un agonista eficaz de MOD-1, y los estudios de comportamiento revelaron efectos sobre la motilidad de los gusanos similares a los mediados por 5-HT. Además, la comparación entre gusanos salvajes y mutantes MOD-1 mostró la contribución parcial de MOD-1 a esta parálisis. En contraste con las observaciones con 5-HT, no se observó la recuperación de la motilidad cuando se expuso a la triptamina. Esta falta de recuperación puede deberse a las diferentes propiedades de recaptación o degradación de los dos ligandos. La mayoría de las vías de síntesis de los neurotransmisores de monoamina son procesos de varios pasos. En los vertebrados, la triptamina se sintetiza a partir del triptófano mediante la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AAAD) y se encuentra en cantidades muy pequeñas en el SNC. Hay varias enzimas no caracterizadas en el genoma de *C. elegans* que podrían servir para

generar triptamina, pero hasta la fecha no se han detectado en *C. elegans* (Hobert, 2013). Así, la posible ausencia de triptamina endógena puede ser uno de los factores de la falta de recuperación de los gusanos, ya que pueden carecer de mecanismos específicos de degradación o recaptación y, por tanto, la triptamina puede comportarse como un xenobiótico.

Por lo tanto, nuestros estudios electrofisiológicos y de comportamiento de los efectos de la triptamina en MOD-1 que permitieron la evaluación de este compuesto a nivel molecular y de organismo revelaron una gran efectividad antihelmíntica. Es así que, la selección de agentes derivados de la triptamina puede ser una vía prometedora para futuras investigaciones.

La primera caracterización de MOD-1 mostró que los neurotransmisores glicina, acetilcolina, GABA, glutamato e histamina no activan MOD-1 (Ranganathan et al., 2000). Dado que varios agentes antihelmínticos actúan como agonistas de los receptores *Cys-loop* que desempeñan funciones fisiológicas importantes, se probó su potencial para activar MOD-1. Nuestros registros de células completas mostraron que la piperazina, la betaína, el levamisol y la ivermectina no son agonistas de MOD-1, lo que aumentó nuestro conocimiento de la farmacología de MOD-1.

En nuestra búsqueda de moduladores de MOD-1, primero se probaron moduladores de receptores *Cys-loop*. En este sentido, IVM ha demostrado tener un amplio espectro de acción, siendo un agonista alostérico, o modulador alostérico positivo y negativo en diferentes receptores *Cys-loop* (Chen y Kubo, 2018; Lynagh y Lynch, 2012). Aquí se demostró que no ejerce una modulación importante de las corrientes de MOD-1. Curiosamente, se reveló que los agonistas GABAérgicos, piperazina, muscimol e isoguvacina, actúan como inhibidores de MOD-1.

Entre los ligandos probados, la piperazina fue el inhibidor más potente y, a nivel conductual, fue aún más potente para contrarrestar los efectos de la 5-HT sobre la motilidad que para producir parálisis a través de la activación de los receptores GABA. Nuestros resultados de MOD-1 expresado heterológamente mostraron que el grado de inhibición de las corrientes máximas por los ligandos GABAérgicos no dependía de la concentración de 5-HT y que la preincubación con el fármaco ejercía un efecto más

profundo que su aplicación conjunta, esto sugirió que la inhibición fue debida a una modulación alostérica negativa. Previamente, se demostró que la mianserina y la metiotepina actúan como antagonistas no competitivos de MOD-1 (Ranganathan et al., 2000). Por lo tanto, al identificar nuevos moduladores, nuestros estudios electrofisiológicos abren puertas para el diseño racional de futuros compuestos antihelmínticos.

Los sitios de unión de los ligandos GABAérgicos como moduladores de MOD-1 siguen siendo desconocidos. Los receptores *Cys-loop* contienen una cavidad transmembrana entre subunidades en la que varios ligandos, incluida la ivermectina y los moduladores alostéricos positivos de los nAChR $\alpha 7$, pueden unirse con diferentes ubicaciones y orientaciones (Sauguet et al., 2015). Los estudios estructurales futuros pueden iluminar nuestra comprensión de los sitios moduladores de MOD-1.

Nuestros resultados mostraron que el antagonismo de MOD-1 ejercido por la PZE tuvo efectos fisiológicos, revelando así un nuevo blanco farmacológico para este agente antiparasitario. Debido a las similitudes de los receptores MOD-1 dentro del filo, estos resultados podrían extrapolarse a especies parasitarias. Hay más de 4100 especies de nematodos fitoparásitos, que representan una gran amenaza en la seguridad alimentaria y causan daños en cultivos económicamente rentables. Las especies de mayor impacto económico pertenecen a los géneros *Heterodera* y *Globodera*. Los nematodos de quiste causan daños significativos a una variedad de cultivos en todo el mundo, en particular en los cultivos de trigo, soja, papa y arroz. Casi todas las especies fitoparasitarias de nematodos poseen estilete, una estructura hueca similar a una lanza que puede sobresalir de su boca y está implicada tanto en la eclosión como en la penetración a la raíz de la planta huésped. Una vez localizada la planta huésped rompen el tejido e ingresan al interior, una vez allí, a través del orificio del estilete, secretan proteínas de las células de la glándula faríngea hacia la célula de alimentación inicial, lo que induce la formación de un sitio de alimentación sincitial. El sincitio es estimulado continuamente por las secreciones del estilete del nematodo y le proporciona todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. El quiste se desprende de la raíz luego de la muerte de la planta y los huevos que están dentro permanecen latentes durante muchos años, hasta que se establecen condiciones favorables para la invasión de una planta

huésped, este ciclo puede repetirse con un retraso de 20 a 30 años. Así, una vez que un campo está contaminado con *Globodera spp*, la amenaza para los cultivos puede ser muy duradera (Cotton et al., 2014; Crisford et al., 2020). Curiosamente, se demostró que la metiotepina, que actúa como antagonista de MOD-1 o SER-7, actúa como un potente inhibidor del empuje del estilete de *G. pallida* y de la invasión de la raíz (Crisford et al., 2020), lo que refuerza la utilidad de los antagonistas de MOD-1 como fármacos antiparasitarios.

En este Capítulo propusimos que los compuestos derivados de PZE y triptamina podrían explorarse como nuevos compuestos con potencial actividad antihelmíntica.

Nuestro estudio desde el nivel molecular hasta el nivel del organismo mejoró nuestro conocimiento de los receptores *Cys-loop* y respaldó a MOD-1 como un blanco prometedor para la terapia antihelmíntica.



CAPÍTULO III

Receptores *Cys-loop* de
Serotonina como
Nuevos Blancos
Terapéuticos:
Reposicionamiento de
Fármacos

INTRODUCCIÓN

El reposicionamiento (o reutilización) de drogas se define como un proceso para identificar una nueva actividad o aplicación a un medicamento existente, aprovechando los perfiles farmacocinéticos, farmacodinámicos y de toxicidad bien conocidos de los fármacos. Esto disminuye sustancialmente el costo y tiempo necesario para el desarrollo de nuevos fármacos. En la actualidad, el tiempo de desarrollo de un nuevo fármaco es de 10 a 15 años (Alavi y Ebrahimi Shahmabadi, 2021). Pese a que los ensayos clínicos no pueden pasarse por alto, los estudios preclínicos a nivel molecular de un fármaco podrían acelerar los procesos de reutilización de un medicamento.

Se presentó en este capítulo una estrategia para el reposicionamiento de fármacos mediante la predicción de la indicación para una enfermedad en particular en función de los blancos terapéuticos anteriormente estudiados a lo largo de esta Tesis. Los medicamentos que no están originalmente indicados para actuar sobre dichos blancos, pero presentan altas probabilidades para hacerlo, sirven como candidatos para la reutilización.

Los enfoques de reposicionamiento de fármacos se dividen en dos grupos principales: estrategias computacionales y experimentales. Los enfoques computacionales consisten en el análisis de datos, por ejemplo, estructura química; y en comparación con los enfoques experimentales, tienen menos barreras y costos más bajos (Sadeghi et al., 2021).

La piperazina, es un anillo heterocíclico de seis miembros, cuatro carbonos y dos nitrógenos en posiciones opuestas, también denominada 1,4-diazaciclohexano. Es un fármaco con múltiples e importantes propiedades farmacológicas descritas hasta la fecha. El esqueleto de piperazina se encuentra en una variedad de fármacos comercializados con diversas categorías terapéuticas. Piperazina y, principalmente, derivados de esta molécula son utilizados como antipsicóticos, antihistamínicos, antidepresivos, anticancerígenos, antivirales, cardioprotectores, antiinflamatorios y antiparasitarios (Rathi et al., 2016).

Aquí se postuló el posible uso de la piperazina y/o sus derivados como potencial agente antiemético y antiinflamatorio del aparato digestivo en el síndrome del intestino irritable actuando a través del receptor 5-HT_{3A} humano.

Por otro lado, la triptamina, es un alcaloide monoamina que se encuentra en plantas, hongos y animales, contiene un anillo indólico y está químicamente relacionado con el aminoácido triptófano. La triptamina se encuentra como traza en el sistema nervioso de mamíferos donde actúa como neuromodulador o neurotransmisor. La triptamina, como se vio, es un agonista parcial del receptor 5-HT_{3A} y muy eficaz de MOD-1. Se decidió testear su derivado sintético, el sumatriptan, usado clínicamente para la migraña, que es un agonista específico y selectivo del receptor 5-HT₁.

Nuestro enfoque de reutilización de fármacos contribuye a identificar nuevos blancos y usos farmacológicos de fármacos clínicos sobre una base racional.

OBJETIVO GENERAL

Dada la potencialidad farmacológica de los receptores de serotonina abordados en esta Tesis y que los resultados hallados sugieren que derivados de piperazina y triptamina actúan sobre los receptores de serotonina. El objetivo general de este tercer capítulo fue comenzar con la exploración del efecto de derivados de dichos compuestos de uso clínico, ya que estos medicamentos serían buenos candidatos para reposicionar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto de los derivados de triptamina y piperazina de uso clínico sobre el receptor MOD-1 utilizando registros de corrientes macroscópicas.
- Estudiar el efecto de piperazina sobre el receptor 5-HT₃A utilizando registros de corrientes macroscópicas y de canal único.
- Estudiar el efecto de los derivados de triptamina y piperazina de uso clínico sobre el receptor 5-HT₃A utilizando registros de corrientes macroscópicas.

RESULTADOS

Efectos de derivados de PZE y triptamina sobre receptores MOD-1

Se exploraron derivados de piperazina (PZE) dado que, como se mencionó en el Capítulo 2 de esta Tesis, PZE actúa como un modulador alostérico negativo de MOD-1. Además, los ensayos de motilidad que utilizaron el modelo de nematodo *C. elegans* mostraron que la modulación negativa afecta el comportamiento del gusano, lo que confirma la inhibición de MOD-1 como un nuevo mecanismo antihelmíntico. Se decidió entonces evaluar el efecto sobre receptores MOD-1 de otros fármacos derivados de PZE utilizados en la actualidad.

Se realizaron registros de corrientes macroscópicas en la configuración *whole-cell* de *patch-clamp* provocadas por la perfusión rápida de 5-HT previamente incubadas con dos derivados de piperazina que son antagonistas del receptor H₁, y se compararon luego con las corrientes en la misma célula evocadas por 5-HT en ausencia de las drogas en estudio.

Se estudió el efecto de Hidroxicina, un antihistamínico de primera generación, y, de Cetirizina, un antihistamínico H₁ de segunda generación, que es el metabolito secundario de Hidroxicina, la cual se utiliza principalmente para alergias cutáneas.

Para evaluar la modulación de MOD-1 por derivados de PZE, primero se siguió el protocolo de preincubación en el que la célula se expuso al compuesto antes de la aplicación de 5-HT. Se aplicó a la célula un pulso de ECS que contenía 1 μ M de 5-HT (corriente de control), luego se expuso la célula durante 60 s a ECS que contenía el fármaco en estudio y, finalmente, se aplicó un segundo pulso de ECS que contenía 1 μ M de 5-HT (corriente tratada). Los cambios en la carga neta y la amplitud de la segunda corriente con respecto a la original se promediaron entre diferentes células. Se observó

que la exposición previa de la célula a 500 μM de hidroxicina condujo a una disminución de la corriente máxima (32,2 %, $p < 0,001$) y de la carga neta (30,3 %, $p < 0,001$, $n = 3$).

Se determinó que la preincubación con diferentes concentraciones de Cetirizina, 5 μM ($n=3$), 10 μM ($n=3$) y 100 μM ($n=3$), no produjo ningún efecto significativo sobre las corrientes evocadas por 5-HT.

Por otro lado, dada la gran eficacia agonista que presentó triptamina sobre MOD-1, y que además afectó la motilidad de los gusanos, indicando que puede ser un nuevo compuesto antihelmíntico, se exploró el efecto de un fármaco derivado de triptamina, el sumatriptán, utilizado actualmente para la migraña. Se halló que la preincubación con 100 μM , 500 μM y 1mM de sumatriptán provocó una marcada inhibición de las corrientes de MOD-1 provocadas por la 5-HT dependiente de la concentración. A 100 μM se vio a una disminución de la corriente máxima (37,9 %, $p = 0,020$) y la disminución de la carga neta fue de 40 %, $p = 0,001$, $n = 3$; a 500 μM , la inhibición de la corriente máxima fue de 47,7 % ($p = 0,001$, $n = 3$) y la disminución de la carga neta fue de 46,9 %, $P = 0,003$, $n = 3$; y a 1 mM, la inhibición del pico de corriente máxima de 5-HT fue aún mayor (59,2 %, $p < 0,001$, $n = 6$) y la disminución de la carga neta de la corriente fue de 51,9 %, $p < 0,001$, $n = 6$ (Figura 38).

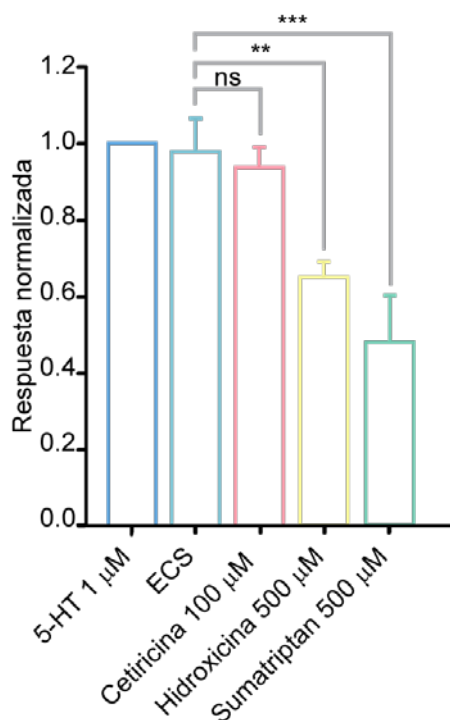


Figura 38. Modulación de MOD-1 por fármacos de uso clínico derivados de PZE y Trip. Gráfico que muestra el efecto de diferentes fármacos en las concentraciones indicadas sobre las corrientes provocadas por 5-HT en el receptor MOD-1. Las barras de color indican la media \pm DE. Prueba t de Student, valores de p para hidroxicina (500 μM , $n = 3$, $p < 0,001$); sumatriptan (500 μM , $n = 3$, $p < 0,001$); cetirizina (100 μM , $n = 3$, $p = 0,543$). *** $p < 0,001$ y ns: estadísticamente no significativo.

Efecto modulador de PZE sobre el receptor 5-HT_{3A_{HC}} evaluado a nivel de corrientes macroscópicas

En primera instancia se decidió explorar si PZE es un modulador del receptor 5-HT_{3A}, dado que no existen reportes en la bibliografía. Para evaluar la modulación de PZE sobre el receptor 5-HT_{3A}, primero se siguió el protocolo de preincubación en el que se aplicó a la célula un pulso de ECS que contenía 2 μ M de 5-HT (corriente de control), luego se expuso la célula durante 60 s a ECS que contenía el fármaco en estudio y, finalmente, se aplicó un segundo pulso de ECS que contenía 2 μ M de 5-HT (tratado). Los cambios en la carga neta y la amplitud de la segunda corriente con respecto a la original se promediaron entre diferentes células.

Además de demostrar que la PZE es un antagonista no competitivo del receptor MOD-1 (Rodríguez Araujo et al., 2022), se descubrió que la PZE inhibió de manera muy potente las corrientes de serotonina del receptor 5-HT_{3A} humano; a una concentración de 1 mM de PZE, las corrientes evocadas por 2 μ M de 5-HT se inhibieron en un 82,5 %, ($P < 0,001$, $n = 5$), y la disminución de la carga neta fue de 87,4% ($P < 0,001$, $n=5$).

Para caracterizar la acción de la PZE como un nuevo inhibidor de 5-HT_{3A}, se construyeron curvas de concentración-respuesta para determinar el valor IC₅₀ para corrientes activadas por 2 μ M de 5-HT y preincubadas durante 60 s con PZE.

Se evidenció que la PZE inhibió las corrientes 5-HT_{3A} con un IC₅₀ de 238 \pm 89 μ M (Figura 39).

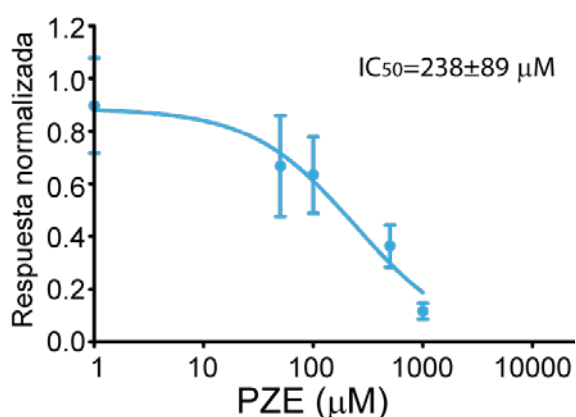


Figura 39. Curva de concentración-respuesta que muestra la inhibición de las corrientes de 5-HT_{3A} por PZE. La curva se ajustó mediante una función logística utilizando Sigma Plot. Cada punto corresponde a la corriente normalizada a una concentración dada de al menos tres experimentos diferentes.

Dado el gran efecto de PZE, se determinó si también afecta las corrientes 5-HT_{3A} cuando se aplica junto con 5-HT (protocolo de co-aplicación). En cada célula, se aplicó tres pulsos de ECS que contenía 2 μ M de 5-HT y luego tres pulsos de ECS que contenían 2 μ M de 5-HT y 1 mM de PZE. La co-aplicación de PZE con 5-HT no produjo cambios estadísticamente significativos en los picos de corrientes ($0,91 \pm 0,09$, $P = 0,617$) ni en la carga neta ($0,93 \pm 0,19$, $P = 0,669$, $n=5$). Así, en contraste con los importantes efectos observados con la preincubación, la co-aplicación de PZE con 5-HT no inhibió las corrientes de 5-HT_{3A} (Figura 40).

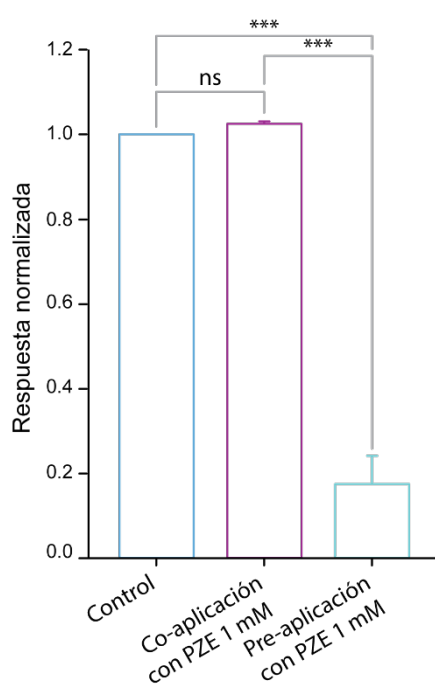


Figura 40. Gráfico de barra que muestra el efecto de 1 mM de PZE sobre el receptor 5-HT_{3A} cuando se utilizan dos protocolos distintos, co-aplicación y preincubación. Las barras de color indican la media \pm DE. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA con la prueba t de Bonferroni. *** $p < 0,001$ y ns: no estadísticamente significativo.

El hecho de que la PZE ejerciera una mayor reducción de corrientes si se preincubaba y no si se co-aplicaba junto con 5-HT sugirió que la inhibición no fue competitiva, y reveló un nuevo blanco farmacológico y una nueva función potencial para este antiparasitario.

Para confirmar que PZE es un modulador alostérico de 5-HT_{3A}, se realizaron experimentos en los que la concentración de PZE durante la preincubación permaneció constante, pero la concentración de 5-HT varió, y se realizó la curva EC₅₀ de serotonina en presencia y en ausencia de PZE. PZE aumentó el EC₅₀ y disminuyó las respuestas máximas a 5-HT ($\alpha=44\%$), lo que sugirió una inhibición no competitiva (Figura 41).

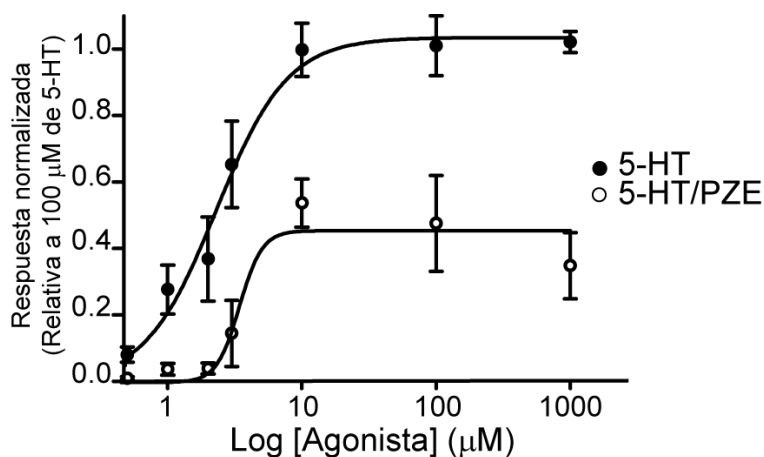


Figura 41. Curvas concentración-respuesta de 5-HT (control) y de 5-HT preincubada con PZE. Los valores corresponden a la corriente máxima relativa a la provocada por 100 μM de 5-HT en la misma célula. Cada punto se muestra como la media \pm DE ($n = 3$).

La presencia de los moduladores alostéricos negativos (NAMs) lleva a un descenso de la potencia normal del agonista, la cual se evidencia por el corrimiento de la curva concentración-efecto a un valor de EC₅₀ mayor que el del control. Además, los receptores no alcanzan el máximo de activación, incluso a altas concentraciones de agonista, demostrando una disminución en la eficacia del agonista.

Efecto modulador de PZE en el receptor 5-HT_{3A_HC} evaluado a nivel de canal único

Para estudiar con más detalle el efecto de la PZE en el receptor 5-HT_{3A} humano, se analizó el efecto de la droga sobre el patrón de activación de dicho receptor generado por 5-HT mediante registros de canal único. Para ello, se transfectaron células BOSC 23 con el ADNc de 5-HT_{3A_{HC}}, y se realizaron registros de canal único en la configuración *cell-attached* sobre las células transfectadas en presencia de 100 μM de PZE + 1 μM de 5-HT, y estos registros fueron comparados con la actividad generada por 1 μM de 5-HT sin PZE.

El análisis preliminar mostró que las duraciones de las aperturas y los *clusters* en presencia de 5-HT y PZE fueron similares al control (5-HT sola) en la concentración testeada, mientras que la frecuencia de los *clusters* detectados en registros realizados en presencia de 5-HT junto con PZE fue sistemáticamente menor con respecto al control.

Es necesario aclarar que éste es un análisis preliminar y que hace falta aumentar la cantidad de registros para poder realizar un análisis cuantitativo y para evitar sesgos relacionados con variaciones en el nivel de expresión de 5-HT_{3A_{HC}} entre diferentes lotes de células (Figura 42).

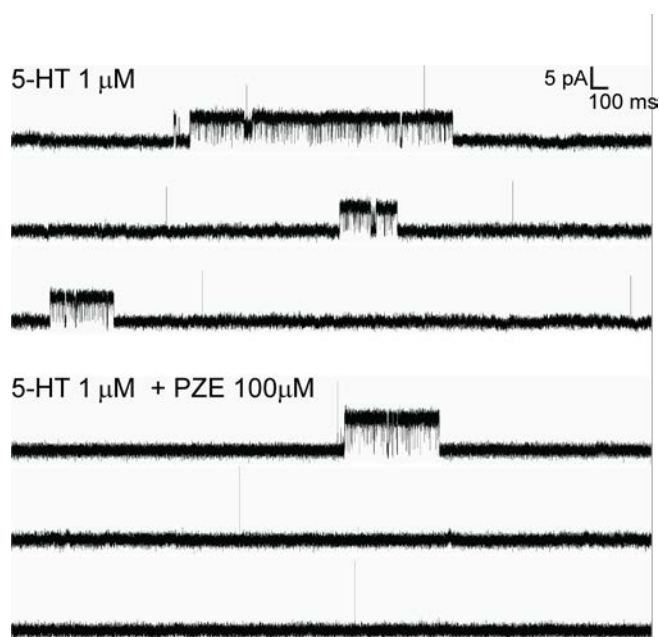


Figura 42. Trazos representativos de registros de canal único del receptor 5-HT_{3A_{HC}} obtenidos con 5-HT (arriba) y con 5-HT junto con PZE (abajo). Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a -70 mV de potencial de membrana.

Estos resultados preliminares indicaron que, en presencia de 5-HT, PZE actúa principalmente como modulador alostérico negativo cuyo efecto principal es reducir la frecuencia de apertura del canal, estabilizando un estado cerrado o desensibilizado.

Efectos de derivados de PZE y derivados de triptamina sobre receptores 5-HT_{3A_{HC}}

Para evaluar el efecto de derivados de PZE sobre el receptor 5-HT_{3A} humano, se realizaron registros macroscópicos en la configuración *whole-cell* sobre las células transfectadas, utilizando el protocolo de preincubación con 5 μM (n=3) y 10 μM (n=3) de hidroxicina. Se observó que a pesar de que la PZE actuó como un inhibidor de las corrientes de 5-HT_{3A}, su derivado de uso clínico, no demostró un efecto modulador significativo de las corrientes evocadas por 5-HT.

Al igual que para MOD-1, se determinó el efecto del derivado de triptamina, sumatriptán, sobre 5-HT_{3A}. Mediante la realización del protocolo de preincubación en la configuración *whole-cell*, se obtuvieron registros macroscópicos que evidenciaron que la exposición previa de la célula a 500 μM de sumatriptán condujo a una disminución de la corriente máxima evocada por 5-HT (31,3 %, p =0,009) y la carga neta (37,6 %, p =0,004, n = 3) de 5-HT_{3A} (Figura 43). Lo que curiosamente evidenció que, mientras triptamina es un agonista parcial muy poco eficaz, su derivado fue un inhibidor.

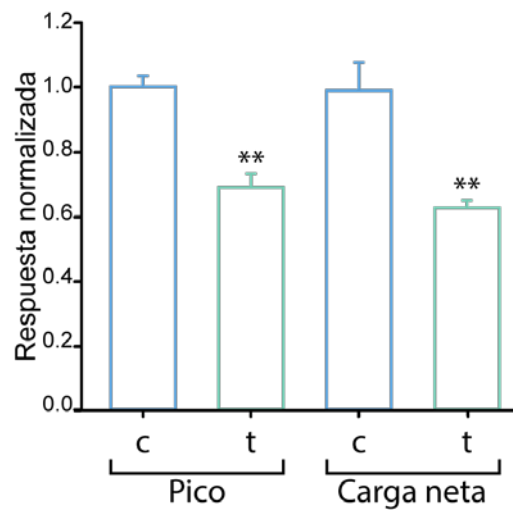


Figura 43. Gráfico de barra que muestra el cambio en el pico y en la carga neta de la corriente del receptor 5-HT₃A evocada por 5-HT (c, control) relacionada con la corriente evocada por 5-HT luego de la preincubación con 500 μ M de sumatriptán (t, tratada). Los valores corresponden al promedio \pm DE (n = 3).

DISCUSIÓN

Hacia el fin de este trabajo de Tesis, se decidió utilizar nuestros conocimientos y estrategias desarrolladas para explorar el reposicionamiento de drogas que, mediante la modulación de canales iónicos activados por serotonina, puedan ser utilizadas como fármacos antiparasitarios o como fármacos para síndrome de colon irritable, náuseas y vómitos provocados por quimioterapia, trastornos a nivel neurológico y psiquiátrico, dolor neuropático, entre otros. El trabajo de este Capítulo mostró los primeros estudios realizados con este fin.

Previamente se demostró que triptamina y derivados de podrían ser buenos candidatos en la terapia antihelmíntica, actuando sobre el receptor MOD-1. El efecto mediado por sumatriptán, de la familia de los triptanes, sobre el receptor MOD-1, demostró inhibir las corrientes evocadas por serotonina sobre dicho receptor, de manera dependiente de la concentración. A futuro se planifica ampliar el conocimiento de las bases moleculares que subyacen a esta inhibición, y realizar estudios de comportamiento sobre los nematodos para confirmar el posible nuevo uso antihelmíntico de este fármaco utilizado para la migraña.

Además, como se postuló anteriormente, debido al potente efecto antagonista no competitivo de PZE sobre el receptor de MOD-1, los fármacos de uso clínico derivados de PZE serían buenos candidatos para la terapia antihelmíntica actuando sobre este nuevo blanco. La preincubación con hidroxicina, fármaco antihistamínico derivado de PZE, antes de la activación del receptor MOD-1 con 5-HT, redujo las corrientes, demostrando tener un efecto inhibitor. Estos resultados preliminares son la base para un estudio más exhaustivo de los mecanismos moleculares que ejercen estos medicamentos sobre este blanco para la terapia antihelmíntica.

En el receptor 5-HT_{3A}, PZE inhibió las corrientes evocadas por 5-HT cuando se preincubó, mientras que no modificó el pico de corriente cuando se co-aplicó junto con el agonista 5-HT. Esto sugirió que la inhibición no fue competitiva, revelando así un nuevo blanco farmacológico y su posible mecanismo para este antiparasitario. Para confirmar

aún más la inhibición no competitiva, se realizaron experimentos en los que la concentración de PZE durante la preincubación permaneció constante, pero la concentración de 5-HT se aumentó. Se observó que PZE aumentó el EC_{50} y disminuyó las respuestas máximas a 5-HT, lo que reforzó que el mecanismo de inhibición de este fármaco sobre el receptor fue por una inhibición no competitiva. A diferencia de los fármacos antieméticos setrones, antagonistas competitivos del receptor 5-HT_{3A}, y al fármaco Vortioxetina, utilizado para depresión, que es un derivado de PZE, (1-[2-(2,4-dimetilfenil-sulfanil)-fenil]-piperazina) y también un antagonista competitivo del receptor 5-HT_{3A} (Ladefoged et al., 2018), la PZE redujo las corrientes del receptor 5-HT_{3A} provocadas por el agonista de forma no competitiva y dependiente de la concentración.

La mayoría de los miembros de la superfamilia pLGIC tienen varias subunidades diferentes que pueden ensamblarse para formar múltiples subtipos de receptores. Cada subunidad influye estructuralmente en las propiedades del canal; por lo tanto, los receptores heteroméricos proporcionan diversidad en propiedades farmacológicas y biofísicas dentro de una familia de receptores. En comparación con los receptores homoméricos, los receptores heteroméricos contienen un mayor número de sitios alostéricos potenciales para la interacción farmacológica (Davies, 2011). Por lo tanto, a futuro, también sería interesante probar el comportamiento de los nuevos moduladores sobre 5-HT₃ heteroméricos que podría orientar, junto a estudios computacionales, a la identificación de sitios alostéricos.

El potencial terapéutico de los ligandos alostéricos deriva de su capacidad para modular la función del receptor mientras mantienen intacto el patrón nativo de activación del receptor. Al disminuir la eficacia del agonista del receptor 5-HT_{3A} endógeno, los moduladores alostéricos negativos de los receptores 5-HT_{3A} pueden actuar como herramientas de ajuste que pueden no afectar las condiciones fisiológicas, pero pueden ser altamente activos en estados fisiopatológicos como NVIQ o SII, sin causar una inhibición completa del receptor. Esto conduciría a un mejor perfil de seguridad en comparación con los antagonistas competitivos (Al Kury et al., 2018).

La estrategia de reposicionar medicamentos, basándonos en su estructura química y su acción a nivel molecular sobre los receptores *Cys-loop* serotoninérgicos estudiados en esta Tesis, brinda orientación para aprovechar la reutilización de fármacos sobre una

base racional y de esta manera reducir tiempos y costos necesarios para el desarrollo de nuevos fármacos.



CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de Tesis se abordó el estudio de los receptores *Cys-loop* serotoninérgicos utilizando dos sistemas diferentes: por un lado, se estudió el receptor 5-HT_{3A} humano como blanco farmacológico relevante para la terapia de náuseas y vómitos relacionados con quimioterapia, síndrome de intestino irritable, desórdenes del sistema nervioso como ansiedad y depresión. Por otro lado, se estudió el receptor de serotonina permeable a cloruro, MOD-1 de *C. elegans*, como blanco prometedor para avanzar en la búsqueda de nuevos agentes para la terapia antihelmíntica.

En el **Capítulo 1** a partir del modelo de alta conductancia del receptor 5-HT_{3A} humano se obtuvo mediante registros de canal único y corrientes macroscópicas información importante sobre las bases mecánicas de la activación ortostérica y de la activación y modulación alostérica por los terpenoides timol y carvacrol. Se logró descifrar por primera vez las diferencias que rigen la activación ortostérica y alostérica de este receptor, que es uno de los menos estudiados de la familia de receptores *Cys-loop*.

En el **Capítulo 2** se demostró que MOD-1 es un blanco promisorio para la terapia antiparasitaria. Dado que este receptor se encuentra limitado al filo y está ausente en vertebrados, emerge como un blanco farmacológico muy interesante. Se ha observado que MOD-1 responde de manera muy diferente a los agonistas parciales de 5-HT_{3A}, lo que reveló una selectividad agonista diferente entre estos dos receptores *Cys-loop* activados por 5-HT. Por lo tanto, aunque comparten 5-HT como su neurotransmisor endógeno, difieren en cómo interactúa en el sitio de unión. También se demostró que el timol, que es un agonista alostérico de los receptores 5-HT_{3A}, no pudo activar MOD-1, lo que indicó diferentes mecanismos o sitios de ago-PAM entre ambos receptores.

Los estudios electrofisiológicos y de comportamiento de los efectos de la triptamina en MOD-1 revelaron una gran efectividad antihelmíntica. Es así que la selección de agentes derivados de la triptamina puede ser una vía prometedora para futuras investigaciones.

Además, en la búsqueda de moduladores de este receptor, los resultados hallados en este capítulo mostraron el antagonismo no competitivo de muscimol y de PZE sobre MOD-1, y que PZE tuvo efectos fisiológicos, revelando así un nuevo objetivo

farmacológico para este agente antiparasitario. Debido a las similitudes de los receptores MOD-1 dentro del filo, estos resultados podrían extrapolarse a especies parasitarias. Se sugirió que, actuando sobre este receptor, compuestos con actividad agonista o moduladores positivos o negativos podrían ejercer un efecto antiparasitario, y precisamente compuestos derivados de PZE y triptamina podrían explorarse como nuevos compuestos con potencial actividad antihelmíntica.

Nuestro estudio desde el nivel molecular hasta el nivel del organismo mejoró nuestro conocimiento de los receptores *Cys-loop* y respaldó a MOD-1 como un blanco antiparasitario prometedor.

En el **Capítulo 3**, aprovechando el conocimiento adquirido sobre estos receptores *Cys-loop* de serotonina, se comenzaron a estudiar estrategias para reposicionar medicamentos de uso clínico, con el fin de minimizar tiempos y costos necesarios para la producción de nuevos fármacos dirigidos a tratar patologías en las que estos receptores están involucrados. Es así que se halló que el sumatriptan, un fármaco comercializado para tratar la migraña, sería un buen candidato para reposicionar para la terapia antiparasitaria. Además, se evidenció que PZE podría reutilizarse como modulador alostérico negativo de los receptores 5-HT_{3A} humano abordando patologías antes mencionadas en las que este receptor está involucrado.

En resumen, aprovechando la potencialidad que brindan los registros de canal único y de corrientes macroscópicas en el estudio de las bases moleculares del funcionamiento y modulación de estos receptores *Cys-loop*, se logró hallar un nuevo blanco antiparasitario, descifrar por primera vez las diferencias de activación ortostérica y alostérica del receptor 5-HT_{3A} humano por timol y carvacrol, y comenzar a generar estrategias de reposicionamiento de fármacos de uso clínico mediante la modulación alostérica de estos receptores tanto en *C. elegans* como en humano.

Estos estudios ampliaron el conocimiento de la función y modulación de los receptores *Cys-loop*, generando una base para abordar patologías que involucran a estos receptores y para el desarrollo de nuevos y más selectivos fármacos.

Abreviaturas

5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina

5-HT₁ a 5-HT₇: receptores de serotonina tipo 1 a 7

5-HT₃AR: receptor de serotonina de tipo 3 homomérico formado por 5 subunidades A.

5-HT₃A_{HC}: receptor de serotonina de tipo 3 homomérico formado por 5 subunidades A, de alta conductancia

5-HT₃R: receptor de serotonina tipo 3

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AMPA: ácido aminometilfosfónico (del inglés: *aminomethylphosponic acid*)

ARNi: ácido ribonucleico de interferencia

DMEM: medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMV: núcleo motor dorsal del vago

EC₅₀: concentración media máxima eficaz (del inglés: *half maximal effective concentration*)

ECD: dominio extracelular (del inglés: *extracellular domain*)

ECS: solución extracelular (del inglés: *Extracellular Solution*)

EGTA: ácido etilen glycol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (del inglés: *ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*)

GABA: ácido γ -aminobutírico

GABA_A: ácido γ -aminobutírico tipo A

GFP: proteína fluorescente verde (del inglés: *Green Fluorescence Protein*)

GluCl: canal de cloruro activado por glutamato

GlyR: receptor de glicina

GPCR: receptor acoplado a proteína G (del inglés: *G-Protein Coupled Receptor*)

HC: alta conductancia (del inglés: *High Conductance*)

HEK293: células embrionarias de riñón humano (del inglés: *Human Embryonic Kidney 293*)

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico (del inglés: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

I_∞: corriente en estado estacionario

IC₅₀: concentración inhibitoria media máxima (del inglés: *half maximal inhibitory concentration*)

ICD: dominio intracelular (del inglés: *intracellular domain*)

ICS: solución intracelular (del inglés: *Intracellular Solution*)

- IVM:** ivermectina
- k_{+b} :** velocidad de bloqueo del canal
- kHz:** kilohertz
- L1 a L4:** estadio larval 1 a 4
- L-AADC:** L-aminoácido aromático descarboxilasa
- LB:** *Lysogeny Broth*
- LGC-50:** receptor catiónico de serotonina
- LGIC:** canales iónicos activados por ligando (del inglés: *Ligand Gated Ion Channel*)
- M1-M4:** segmentos transmembrana 1 a 4
- MAO:** monoamino oxidasa
- MIL:** máximo intervalo de probabilidad (del inglés: *maximum interval likelihood*)
- MOD-1:** receptor aniónico de serotonina
- MOD-5:** transportador de recaptación de serotonina
- nAChR:** receptor nicotínico de acetilcolina (del inglés: *nicotinic acetylcholine receptor*)
- NAM:** modulador alostérico negativo
- NGM:** medio para el crecimiento de nematodos (del inglés: *nematode growth médium*)
- NMDA:** n-Metil-D-aspartato (del inglés: *n-Methyl-D-aspartate*)
- NT:** Neurotransmisor
- NTS:** núcleo del tracto solitario
- OP50:** cepa de *Escherichia coli*
- P_{apertura} :** probabilidad de apertura
- PAM:** modulador alostérico positivo
- pLGICs:** canales iónicos pentaméricos activados por ligando (del inglés: *pentameric Ligand-Gated Ion Channels*)
- PZE:** piperazina
- SD:** desviación estándar (del inglés: *Standard Deviation*)
- SDS:** dodecilsulfato sódico
- SER-1 a SER-7:** receptores metabotrópicos de serotonina
- SNC:** sistema nervioso central
- SNC-GI:** sistema nervioso central-gastro intestinal
- SNP:** sistema nervioso periférico
- TMD:** dominio transmembrana (del inglés: *transmembrane domain*)
- TPH:** triptófano hidroxilasa
- VNC:** cordón nervioso ventral
- WT:** salvaje (del inglés: *Wild – Type*)
- τ_{10-90} :** tiempo que transcurre entre el 10% y el 90% del máximo de corriente

τ_{crit} : tiempo crítico

τ_d : constante de decaimiento de corrientes macroscópicas

τ_{fast} : constante de tiempo de decaimiento rápida

τ_{slow} : constante de tiempo de decaimiento lenta

BIBLIOGRAFÍA

- Accardi, M. V., Beech, R. N., y Forrester, S. G. (2012). Nematode cys-loop GABA receptors: biological function, pharmacology and sites of action for anthelmintics. *Invertebrate Neuroscience*, 12(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s10158-012-0129-6>
- Al Kury, L. T., Mahgoub, M., Howarth, F. C., y Oz, M. (2018). Natural Negative Allosteric Modulators of 5-HT₃ Receptors. *Molecules*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23123186>
- Alavi, S. E., y Ebrahimi Shahmabadi, H. (2021). Anthelmintics for drug repurposing: Opportunities and challenges. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(5), 434–445. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2021.04.004>
- Altun, Z. F., y Hall, D. . (2009). Introduction to *C. elegans* Anatomy. *Control*, April.
- Amin, J., y Subbarayan, M. S. (2017). Orthosteric- versus allosteric-dependent activation of the GABA_A receptor requires numerically distinct subunit level rearrangements. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-08031-9>
- Andersen, N., Corradi, J., Sine, S. M., y Bouzat, C. (2013). Stoichiometry for activation of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20819–20824. https://doi.org/10.1073/PNAS.1315775110/SUPPL_FILE/PNAS.201315775SI.PDF
- Angstadt, J. D., Donmoyer, J. E., y Stretton, A. O. W. (1989). Retrovesicular ganglion of the nematode *Ascaris*. *The Journal of Comparative Neurology*, 284(3), 374–388. <https://doi.org/10.1002/cne.902840305>
- Ashoor, A., Nordman, J. C., Veltri, D., Yang, K. H. S., Shuba, Y., Al Kury, L., Sadek, B., Howarth, F. C., Shehu, A., Kabbani, N., y Oz, M. (2013). Menthol Inhibits 5-HT₃ Receptor–Mediated Currents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347(2), 398–409. <https://doi.org/10.1124/JPET.113.203976>
- Atif, M., Smith, J. J., Estrada-Mondragon, A., Xiao, X., Salim, A. A., Capon, R. J., Lynch, J. W., y Keramidas, A. (2019). GluCLR-mediated inhibitory postsynaptic currents reveal targets for ivermectin and potential mechanisms of ivermectin resistance. *PLOS Pathogens*, 15(1), e1007570. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007570>
- Baptista-Hon, D. T., Deeb, T. Z., Othman, N. A., Sharp, D., y Hales, T. G. (2012). The 5-HT₃B subunit affects high-potency inhibition of 5-HT₃ receptors by morphine. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 693–704. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01582.X>

- Basak, S., Gicheru, Y., Samanta, A., Molugu, S. K., Huang, W., Fuente, M. la de, Hughes, T., Taylor, D. J., Nieman, M. T., Moiseenkova-Bell, V., y Chakrapani, S. (2018). Cryo-EM structure of 5-HT_{3A} receptor in its resting conformation. *Nature Communications*, *9*(1), 514. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02997-4>
- Basak, S., Kumar, A., Ramsey, S., Gibbs, E., Kapoor, A., Filizola, M., y Chakrapani, S. (2020). High-resolution structures of multiple 5-HT_{3A}R-setron complexes reveal a novel mechanism of competitive inhibition. *ELife*, *9*, 1–56. <https://doi.org/10.7554/eLife.57870>
- Beech, R. N., Callanan, M. K., Rao, V. T. S., Dawe, G. B., y Forrester, S. G. (2013). Characterization of cys-loop receptor genes involved in inhibitory amine neurotransmission in parasitic and free living nematodes. *Parasitology International*, *62*(6), 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.03.010>
- Beech, R. N., y Neveu, C. (2015). The evolution of pentameric ligand-gated ion-channels and the changing family of anthelmintic drug targets. *Parasitology*, *142*(2), 303–317. <https://doi.org/10.1017/S003118201400170X>
- Beene, D. L., Brandt, G. S., Zhong, W., Zacharias, N. M., Lester, H. A., y Dougherty, D. A. (2002). Cation- π Interactions in Ligand Recognition by Serotonergic (5-HT_{3A}) and Nicotinic Acetylcholine Receptors: The Anomalous Binding Properties of Nicotine. *Biochemistry*, *41*(32), 10262–10269. <https://doi.org/10.1021/bi020266d>
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., y Hotez, P. J. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. In *Lancet* (Vol. 367, Issue 9521). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)
- Billen, B., Spurny, R., Brams, M., Van Elk, R., Valera-Kummer, S., Yakel, J. L., Voets, T., Bertrand, D., Smit, A. B., y Ulens, C. (2012). Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(23), 9173–9178. https://doi.org/10.1073/PNAS.1116397109/SUPPL_FILE/PNAS.201116397SI.PDF
- Blunden, G. (2003). Betaines in the plant kingdom and their use in ameliorating stress conditions in plants. *Acta Horticulturae*, *597*(597), 23–29. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.597.2>
- Bouzat, C., Bartos, M., Corradi, J., y Sine, S. M. (2008). The Interface between Extracellular and Transmembrane Domains of Homomeric Cys-Loop Receptors Governs Open-Channel Lifetime and Rate of Desensitization. *The Journal of Neuroscience*, *28*(31), 7808. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0448-08.2008>
- Bouzat, C., y Sine, S. M. (2018). Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level. *British Journal of Pharmacology*, *175*(11), 1789–1804. <https://doi.org/10.1111/BPH.13770>

- Brady, C. A., Stanford, I. M., Ali, I., Lin, L., Williams, J. M., Dubin, A. E., Hope, A. G., y Barnes, N. M. (2001). Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT_{3A} receptors versus heteromeric 5-HT_{3A}/3B receptors. *Neuropharmacology*, *41*(2), 282–284. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00074-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00074-0)
- Chatzidaki, A., y Millar, N. S. (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, *97*(4), 408–417. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2015.07.028>
- Chen, I.-S., y Kubo, Y. (2018). Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. *The Journal of Physiology*, *596*(10), 1833–1845. <https://doi.org/10.1113/JP275236>
- Christensen, M., Estevez, A., Yin, X., Fox, R., Morrison, R., McDonnell, M., Gleason, C., Miller, D. M., y Strange, K. (2002). A Primary Culture System for Functional Analysis of *C. elegans* Neurons and Muscle Cells. *Neuron*, *33*(4), 503–514. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00591-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00591-3)
- Churgin, M. A., McCloskey, R. J., Peters, E., y Fang-Yen, C. (2017). Antagonistic Serotonergic and Octopaminergic Neural Circuits Mediate Food-Dependent Locomotory Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*, *37*(33), 7811–7823. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2636-16.2017>
- Colquhoun, D. (1998). Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *British Journal of Pharmacology*, *125*(5), 923. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0702164>
- Corradi, J., Andersen, N., y Bouzat, C. (2011). A Novel Mechanism of Modulation of 5-HT_{3A} Receptors by Hydrocortisone. *Biophysical Journal*, *100*(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2010.10.046>
- Corradi, J., y Bouzat, C. (2014). Unraveling Mechanisms Underlying Partial Agonism in 5-HT_{3A} Receptors. *Journal of Neuroscience*, *34*(50), 16865–16876. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1970-14.2014>
- Corradi, J., y Bouzat, C. (2016). Understanding the Bases of Function and Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Molecular Pharmacology*, *90*(3), 288–299. <https://doi.org/10.1124/MOL.116.104240>
- Corradi, J., Gumilar, F., y Bouzat, C. (2009). Single-Channel Kinetic Analysis for Activation and Desensitization of Homomeric 5-HT_{3A} Receptors. *Biophysical Journal*, *97*(5), 1335–1345. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.018>
- Corradi, J., Thompson, A. J., McGonigle, I., Price, K. L., Bouzat, C., y Lummis, S. C. R. (2015). 5-HT₃ Receptor Brain-Type B-Subunits are Differentially Expressed in Heterologous Systems. *ACS Chemical Neuroscience*, *6*(7), 1158–1164. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.5B00080/ASSET/IMAGES/LARGE/CN-2015-00080F_0009.JPEG

- Cotton, J. A., Lilley, C. J., Jones, L. M., Kikuchi, T., Reid, A. J., Thorpe, P., Tsai, I. J., Beasley, H., Blok, V., Cock, P. J. A., den Akker, S. E. van, Holroyd, N., Hunt, M., Mantelin, S., Naghra, H., Pain, A., Palomares-Rius, J. E., Zarowiecki, M., Berriman, M., ... Urwin, P. E. (2014). The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a cyst nematode. *Genome Biology*, 15(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r43>
- Crisford, A., Calahorra, F., Ludlow, E., Marvin, J. M. C., Hibbard, J. K., Lilley, C. J., Kearn, J., Keefe, F., Johnson, P., Harmer, R., Urwin, P. E., O'Connor, V., y Holden-Dye, L. (2020). Identification and characterisation of serotonin signalling in the potato cyst nematode *Globodera pallida* reveals new targets for crop protection. *PLOS Pathogens*, 16(10), e1008884. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008884>
- Davies, P. A. (2011). Allosteric modulation of the 5-HT₃ receptor. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.01.010>
- Davies, P. A., Pistis, M., Hanna, M. C., Peters, J. A., Lambert, J. J., Hales, T. G., y Kirkness, E. F. (1999). The S-HT₃B subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature*, 397(6717), 359–363. <https://doi.org/10.1038/16941>
- Degani-Katzav, N., Gortler, R., Gorodetzki, L., y Paas, Y. (2016). Subunit stoichiometry and arrangement in a heteromeric glutamate-gated chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1423753113>
- Dent, J. A. (2006). Evidence for a Diverse Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channel Superfamily in Early Bilateria. *Journal of Molecular Evolution*, 62(5), 523–535. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0018-2>
- Ferreira, J. V. N., Capello, T. M., Siqueira, L. J. A., Lago, J. H. G., y Caseli, L. (2016). Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface and Molecular Simulation. *Langmuir*, 32(13), 3234–3241. https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.6B00600/ASSET/IMAGES/LARGE/LA-2016-006008_0009.JPEG
- Ferreira Junior, W. A., Zaharenko, A. J., Kazuma, K., Picolo, G., Gutierrez, V. P., De Freitas, J. C., Konno, K., y Cury, Y. (2017). Peripheral 5-HT₃ Receptors Are Involved in the Antinociceptive Effect of Bunodosine 391. *Toxins 2018*, Vol. 10, Page 12, 10(1), 12. <https://doi.org/10.3390/TOXINS10010012>
- Fissiha, W., y Kinde, M. Z. (2021). Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 14). <https://doi.org/10.2147/IDR.S332378>
- Gao, F., Bren, N., Burghardt, T. P., Hansen, S., Henschman, R. H., Taylor, P., McCammon, J. A., y Sine, S. M. (2005). Agonist-mediated Conformational Changes in Acetylcholine-binding Protein Revealed by Simulation and Intrinsic Tryptophan Fluorescence. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8443–8451. <https://doi.org/10.1074/JBC.M412389200>

- Gibbs, E., y Chakrapani, S. (2021). Structure, Function and Physiology of 5-Hydroxytryptamine Receptors Subtype 3. *Subcellular Biochemistry*, 96, 373–408. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58971-4_11/COVER
- Gielen, M., Corringer, P.-J., Gielen, M., y Corringer, P.-J. (2018). The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *The Journal of Physiology*, 596(10), 1873–1902. <https://doi.org/10.1113/JP275100>
- Gilmore, J., D'amato, S., Griffith, N., y Schwartzberg, L. (2018). Recent advances in antiemetics: new formulations of 5-HT₃-receptor antagonists. *Cancer Management and Research*, 10, 1827–1857. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S166912>
- Grazioso, G., Sgrignani, J., Capelli, R., Matera, C., Dallanocce, C., De Amici, M., y Cavalli, A. (2015). Allosteric Modulation of Alpha7 Nicotinic Receptors: Mechanistic Insight through Metadynamics and Essential Dynamics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(12), 2528–2539. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.5B00459/ASSET/IMAGES/LARGE/CI-2015-00459M_0007.JPEG
- Gürel, G., Gustafson, M. A., Pepper, J. S., Horvitz, H. R., y Koelle, M. R. (2012). Receptors and Other Signaling Proteins Required for Serotonin Control of Locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 192(4), 1359–1371. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.142125>
- Hamdan, F. F., Ungrin, M. D., Abramovitz, M., y Ribeiro, P. (2001). Characterization of a Novel Serotonin Receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1372–1383. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721372.x>
- Hansen, T. V. A., Sager, H., Toutain, C. E., Courtot, E., Neveu, C., y Charvet, C. L. (2022). The *Caenorhabditis elegans* DEG-3/DES-2 Channel Is a Betaine-Gated Receptor Insensitive to Monepantel. *Molecules*, 27(1), 312. <https://doi.org/10.3390/molecules27010312>
- Hapiak, V. M., Hobson, R. J., Hughes, L., Smith, K., Harris, G., Condon, C., Komuniecki, P., y Komuniecki, R. W. (2009). Dual Excitatory and Inhibitory Serotonergic Inputs Modulate Egg Laying in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 181(1), 153–163. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.096891>
- Hassaine, G., Deluz, C., Grasso, L., Wyss, R., Tol, M. B., Hovius, R., Graff, A., Stahlberg, H., Tomizaki, T., Desmyter, A., Moreau, C., Li, X. D., Poitevin, F., Vogel, H., y Nury, H. (2014). X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* 2014 512:7514, 512(7514), 276–281. <https://doi.org/10.1038/nature13552>
- Hernando, G., Bergé, I., Rayes, D., y Bouzat, C. (2012). Contribution of Subunits to *Caenorhabditis elegans* Levamisole-Sensitive Nicotinic Receptor Function. *Molecular Pharmacology*, 82(3), 550–560. <https://doi.org/10.1124/mol.112.079962>
- Hernando, G., y Bouzat, C. (2014). *Caenorhabditis elegans* Neuromuscular Junction: GABA Receptors and Ivermectin Action. *PLoS ONE*, 9(4), e95072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095072>

- Hernando, G., Turani, O., y Bouzat, C. (2019). *Caenorhabditis elegans* muscle Cys-loop receptors as novel targets of terpenoids with potential anthelmintic activity. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(11), e0007895. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007895>
- Hibbs, R. E., Sulzenbacher, G., Shi, J., Talley, T. T., Conrod, S., Kem, W. R., Taylor, P., Marchot, P., y Bourne, Y. (2009). Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *The EMBO Journal*, 28(19), 3040–3051. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.227>
- Hobert, O. (2013). Classical genetic methods. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–22. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.1>
- Hobson, R. J., Geng, J., Gray, A. D., y Komuniecki, R. W. (2003). SER-7B, a constitutively active Gas coupled 5-HT7-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motorneuron. *Journal of Neurochemistry*, 87(1), 22–29. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01967.x>
- Holden-Dye, L. (2007). Anthelmintic drugs. *WormBook*, 1–13. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.143.1>
- Holden-Dye, L., y Walker, R. J. (2006). Actions of glutamate and ivermectin on the pharyngeal muscle of *Ascaridia galli*: A comparative study with *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*, 36(4), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.11.006>
- Hope, A. G., Peters, J. A., Brown, A. M., Lambert, J. J., y Blackburn, T. P. (1996). Characterization of a human 5-hydroxytryptamine receptor type 3A (hs5-HT_{3A}) subunit stably expressed in HEK 293 cells. *British Journal of Pharmacology*, 118(5), 1237–1245. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1996.TB15529.X>
- Iwanir, S., Brown, A. S., Nagy, S., Najjar, D., Kazakov, A., Lee, K. S., Zaslaver, A., Levine, E., y Biron, D. (2016). Serotonin promotes exploitation in complex environments by accelerating decision-making. *BMC Biology*, 14(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0232-y>
- Jarvis, G. E., Barbosa, R., y Thompson, A. J. (2016). Noncompetitive Inhibition of 5-HT₃ Receptors by Citral, Linalool, and Eucalyptol Revealed by Nonlinear Mixed-Effects Modeling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 356(3), 549–562. <https://doi.org/10.1124/JPET.115.230011>
- Jenkins, T., Blunden, G., Wu, Y., Hankins, S. D., y Gabrielsen, B. O. (1998). Are the reductions in nematode attack on plants treated with seaweed extracts the result of stimulation of the formaldehyde cycle? *Acta Biologica Hungarica*, 49(2–4), 421–427. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10526988>
- Johnston, G. A. R. (2014). Muscimol as an Ionotropic GABA Receptor Agonist. *Neurochemical Research*, 39(10), 1942–1947. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1245-y>
- Juza, R., Vlcek, P., Mezeiova, E., Musilek, K., Soukup, O., y Korabecny, J. (2020). Recent advances with 5-HT₃ modulators for neuropsychiatric and gastrointestinal disorders. *Medicinal Research Reviews*,

- 40(5), 1593–1678. <https://doi.org/10.1002/MED.21666>
- Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report. *Trends in Parasitology*, 20(10), 477–481. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>
- Kelley, S. P., Dunlop, J. I., Kirkness, E. F., Lambert, J. J., y Peters, J. A. (2003). A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* 2003 424:6946, 424(6946), 321–324. <https://doi.org/10.1038/nature01788>
- Kesters, D., Thompson, A. J., Brams, M., van Elk, R., Spurny, R., Geitmann, M., Villalgordo, J. M., Guskov, A., Helena Danielson, U., Lummis, S. C. R., Smit, A. B., y Ulens, C. (2013). Structural basis of ligand recognition in 5-HT₃ receptors. *EMBO Reports*, 14(1), 49–56. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.189>
- Krashia, P., Lape, R., Lodesani, F., Colquhoun, D., y Sivilotti, L. G. (2011). The long activations of α 2 glycine channels can be described by a mechanism with reaction intermediates (“flip”). *Journal of General Physiology*, 137(2), 197–216. <https://doi.org/10.1085/JGP.201010521>
- Kullyev, A., Dempsey, C. M., Miller, S., Kuan, C. J., Hapiak, V. M., Komuniecki, R. W., Griffin, C. T., y Sze, J. Y. (2010). A genetic survey of fluoxetine action on synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 186(3), 929–941. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.118877>
- Ladefoged, L. K., Munro, L., Pedersen, A. J., Lummis, S. C. R., Bang-Andersen, B., Balle, T., Schiøtt, B., y Kristensen, A. S. (2018). Modeling and mutational analysis of the binding mode for the multimodal antidepressant drug vortioxetine to the human 5-HT_{3A} receptor. *Molecular Pharmacology*, 94(6). <https://doi.org/10.1124/mol.118.113530>
- Lansdell, S. J., Sathyaprakash, C., Doward, A., y Millar, N. S. (2015). Activation of Human 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptors via an Allosteric Transmembrane Site. *Molecular Pharmacology*, 87(1), 87–95. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094540>
- Lape, R., Colquhoun, D., y Sivilotti, L. G. (2008). On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature* 2008 454:7205, 454(7205), 722–727. <https://doi.org/10.1038/nature07139>
- Lasala, M., Corradi, J., Bruzzone, A., Del Carmen Esandi, M., y Bouzat, C. (2018). A human-specific, truncated α 7 nicotinic receptor subunit assembles with full-length α 7 and forms functional receptors with different stoichiometries. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10707–10717. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA117.001698>
- Law, W., Wuescher, L. M., Ortega, A., Hapiak, V. M., Komuniecki, P. R., y Komuniecki, R. (2015). Heterologous Expression in Remodeled *C. elegans*: A Platform for Monoaminergic Agonist Identification and Anthelmintic Screening. *PLOS Pathogens*, 11(4), e1004794. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004794>

- Lovinger, D. M., y Zhou, Q. (1998). Alcohol effects on the 5-HT₃ ligand-gated ion channel. *Toxicology Letters*, 100–101, 239–246. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00191-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00191-X)
- Lynagh, T., y Lynch, J. W. (2012). Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(8), 432–441. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.05.002>
- Ma, X., Meng, H., y Lai, L. (2016). Motions of Allosteric and Orthosteric Ligand-Binding Sites in Proteins are Highly Correlated. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(9), 1725–1733. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.6B00039/ASSET/IMAGES/LARGE/CI-2016-00039E_0004.JPEG
- Maricq, A. V., Peterson, A. S., Brake, A. J., Myers, R. M., y Julius, D. (1991). Primary Structure And Functional Expression of the 5-HT₃ Receptor, A Serotonin-gated Ion Channel. *Science*, 254(5030), 432–437. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1718042>
- Meiboom, M. F., Barann, M., Witten, S., Groeneveld, K., y Urban, B. W. (2013). Which agonist properties are important for the activation of 5-HT_{3A} receptors? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(11), 2564–2573. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2013.06.013>
- Miller, P. S., y Smart, T. G. (2010). Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(4), 161–174. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2009.12.005>
- Morud, J., Hardege, I., Liu, H., Wu, T., Choi, M. K., Basu, S., Zhang, Y., y Schafer, W. R. (2021). Deorphanization of novel biogenic amine-gated ion channels identifies a new serotonin receptor for learning. *Current Biology*, 31(19), 4282–4292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.036>
- Mott, D. D., Erreger, K., Banke, T. G., y Traynelis, S. F. (2001). Open probability of homomeric murine 5-HT_{3A} serotonin receptors depends on subunit occupancy. *Journal of Physiology*, 535(2), 427–443. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7793.2001.00427.X>
- Mu, T.-W., Lester, H. A., y Dougherty, D. A. (2003). Different Binding Orientations for the Same Agonist at Homologous Receptors: A Lock and Key or a Simple Wedge? *Journal of the American Chemical Society*, 125(23), 6850–6851. <https://doi.org/10.1021/ja0348086>
- Mukhtasimova, N., Lee, W. Y., Wang, H. L., y Sine, S. M. (2009). Detection and trapping of intermediate states priming nicotinic receptor channel opening. *Nature* 2009 459:7245, 459(7245), 451–454. <https://doi.org/10.1038/nature07923>
- Muroi, Y., Theusch, C. M., Czajkowski, C., y Jackson, M. B. (2009). Distinct Structural Changes in the GABA_A Receptor Elicited by Pentobarbital and GABA. *Biophysical Journal*, 96(2), 499–509. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2008.09.037>
- Neher, E., y Steinbach, J. H. (1978). Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *The Journal of Physiology*, 277(1), 153–176. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1978.SP012267>

- Newman, A. S., Batis, N., Grafton, G., Caputo, F., Brady, C. A., Lambert, J. J., Peters, J. A., Gordon, J., Brain, K. L., Powell, A. D., y Barnes, N. M. (2013). 5-Chloroindole: a potent allosteric modulator of the 5-HT₃ receptor. *British Journal of Pharmacology*, 169(6), 1228–1238. <https://doi.org/10.1111/BPH.12213>
- Niesler, B. (2011). 5-HT₃ receptors: potential of individual isoforms for personalised therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2011.01.011>
- Niesler, B., Frank, B., Kapeller, J., y Rappold, G. A. (2003). Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene*, 310(1–2), 101–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00503-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00503-1)
- Niesler, B., Walstab, J., Combrink, S., Möller, D., Kapeller, J., Rietdorf, J., Bönisch, H., Göthert, M., Rappold, G., y Brüß, M. (2007). Characterization of the Novel Human Serotonin Receptor Subunits 5-HT₃C, 5-HT₃D, and 5-HT₃E. *Molecular Pharmacology*, 72(1), 8–17. <https://doi.org/10.1124/MOL.106.032144>
- Olde, B., y McCombie, W. R. (1997). Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Neuroscience*, 8(1), 53–62. <https://doi.org/10.1007/BF02736863>
- Oz, M. (2005). Receptor-Independent Effects of Endocannabinoids on Ion Channels. *Current Pharmaceutical Design*, 12(2), 227–239. <https://doi.org/10.2174/138161206775193073>
- Pandhare, A., Pirayesh, E., Stuebler, A. G., y Jansen, M. (2019). Triple arginines as molecular determinants for pentameric assembly of the intracellular domain of 5-HT_{3A} receptors. *Journal of General Physiology*, 151(9), 1135–1145. <https://doi.org/10.1085/JGP.201912421>
- Peden, A. S., Mac, P., Fei, Y.-J., Castro, C., Jiang, G., Murfitt, K. J., Miska, E. A., Griffin, J. L., Ganapathy, V., y Jorgensen, E. M. (2013). Betaine acts on a ligand-gated ion channel in the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1794–1801. <https://doi.org/10.1038/nn.3575>
- Perry, B. D., y Randolph, T. F. (1999). Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology*, 84(3–4), 145–168. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00040-0)
- Pertz, H. H., Lehmann, J., Roth-Ehrang, R., y Elz, S. (2011). Effects of Ginger Constituents on the Gastrointestinal Tract: Role of Cholinergic M3 and Serotonergic 5-HT₃ and 5-HT₄ Receptors. *Planta Medica*, 77(10), 973–978. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1270747>
- Peters, J. A., Carland, J. E., Cooper, M. A., Livesey, M. R., Deeb, T. Z., Hales, T. G., y Lambert, J. J. (2006).

- Novel structural determinants of single-channel conductance in nicotinic acetylcholine and 5-hydroxytryptamine type-3 receptors. *Biochemical Society Transactions*, 34(5), 882–886. <https://doi.org/10.1042/BST0340882>
- Polovinkin, L., Hassaine, G., Perot, J., Neumann, E., Jensen, A. A., Lefebvre, S. N., Corringer, P. J., Neyton, J., Chipot, C., Dehez, F., Schoehn, G., y Nury, H. (2018). Conformational transitions of the serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* 2018 563:7730, 563(7730), 275–279. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0672-3>
- Price, K. L., Hirayama, Y., y Lummis, S. C. R. (2017). Subtle Differences among 5-HT₃AC, 5-HT₃AD, and 5-HT₃AE Receptors Are Revealed by Partial Agonists. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(5), 1085–1091. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.6B00416/ASSET/IMAGES/LARGE/CN-2016-00416M_0005.JPEG
- Price, K. L., y Lummis, S. C. R. (2014). An atypical residue in the pore of *Varroa destructor* GABA-activated RDL receptors affects picrotoxin block and thymol modulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 55, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.10.002>
- Puspita, W. L., Khayan, K., Hariyadi, D., Anwar, T., Wardoyo, S., y Ihsan, B. M. (2020). Health Education to Reduce Helminthiasis: Deficits in Diets in Children and Achievement of Students of Elementary Schools at Pontianak, West Kalimantan. *Journal of Parasitology Research*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4846102>
- Ranganathan, R., Cannon, S. C., y Horvitz, H. R. (2000). MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature*, 408(6811), 470–475. <https://doi.org/10.1038/35044083>
- Rathi, A. K., Syed, R., Shin, H. S., y Patel, R. V. (2016). Piperazine derivatives for therapeutic use: a patent review (2010-present). <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1189902>, 26(7), 777–797. <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1189902>
- Rayes, D., De Rosa, M. J., Sine, S. M., y Bouzat, C. (2009). Number and locations of agonist binding sites required to activate homomeric cys-loop receptors. *Journal of Neuroscience*, 29(18), 6022–6032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0627-09.2009>
- Rayes, D., Spitzmaul, G., Sine, S. M., y Bouzat, C. (2005). Single-Channel Kinetic Analysis of Chimeric $\alpha 7$ –5-HT₃A Receptors. *Molecular Pharmacology*, 68(5), 1475–1483. <https://doi.org/10.1124/MOL.105.015438>
- Rodriguez Araujo, N., Fabiani, C., Mazzarini Dimarco, A., Bouzat, C., y Corradi, J. (2020). Orthosteric and Allosteric Activation of Human 5-HT₃A Receptors. *Biophysical Journal*, 119(8), 1670–1682. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.08.029>
- Rodriguez Araujo, N., Hernando, G., Corradi, J., y Bouzat, C. (2022). The nematode serotonin-gated

- chloride channel MOD-1: A novel target for anthelmintic therapy. *Journal of Biological Chemistry*, 298(9), 102356. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.102356>
- Rufener, L., Bedoni, N., Baur, R., Rey, S., Glauser, D. A., Bouvier, J., Beech, R., Sigel, E., y Puoti, A. (2013). acr-23 Encodes a Monepantel-Sensitive Channel in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathogens*, 9(8), e1003524. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003524>
- Sadeghi, H. M., Adeli, I., Mousavi, T., Daniali, M., Nikfar, S., y Abdollahi, M. (2021). Drug repurposing for the management of depression: Where do we stand currently? *Life*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/life11080774>
- Sangaletti, R., y Bianchi, L. (2013). A method for culturing embryonic *C. elegans* cells. *Journal of Visualized Experiments*, 79. <https://doi.org/10.3791/50649>
- Sauguet, L., Shahsavar, A., y Delarue, M. (2015). Crystallographic studies of pharmacological sites in pentameric ligand-gated ion channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(3), 511–523. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.007>
- Sauguet, L., Shahsavar, A., Poitevin, F., Huon, C., Menny, A., Nemezc, À., Haouz, A., Changeux, J. P., Corringier, P. J., y Delarue, M. (2014). Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 966–971. https://doi.org/10.1073/PNAS.1314997111/SUPPL_FILE/SM03.MPG
- Schafer, W. R., y Kenyon, C. J. (1995). A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 375(6526), 73–78. <https://doi.org/10.1038/375073a0>
- Sepúlveda-Crespo, D., Reguera, R. M., Rojo-Vázquez, F., Balaña-Fouce, R., y Martínez-Valladares, M. (2020). Drug discovery technologies: *Caenorhabditis elegans* as a model for anthelmintic therapeutics. *Medicinal Research Reviews*, 40(5), 1715–1753. <https://doi.org/10.1002/med.21668>
- Shapiro, S., y Guggenheim, B. (1995). The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 10(4), 241–246. <https://doi.org/10.1111/J.1399-302X.1995.TB00149.X>
- Sivilotti, L., y Colquhoun, D. (2016). In praise of single channel kinetics. *Journal of General Physiology*, 148(2), 79–88. <https://doi.org/10.1085/JGP.201611649>
- Solt, K., Ruesch, D., Forman, S. A., Davies, P. A., y Raines, D. E. (2007). Differential effects of serotonin and dopamine on human 5-HT_{3A} receptor kinetics: Interpretation within an allosteric kinetic model. *Journal of Neuroscience*, 27(48), 13151–13160. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3772-07.2007>
- Steppek, G., Buttle, D. J., Duce, I. R., y Behnke, J. M. (2006). Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required? *International Journal of Experimental Pathology*, 87(5), 325–

341. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2613.2006.00495.X>
- Tsalik, E. L., Niacaris, T., Wenick, A. S., Pau, K., Avery, L., y Hobert, O. (2003). LIM homeobox gene-dependent expression of biogenic amine receptors in restricted regions of the *C. elegans* nervous system. *Developmental Biology*, 263(1), 81–102. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00447-0](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00447-0)
- Tsuchiya, H. (2017). Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity. *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 1369, 22(8), 1369. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22081369>
- Turani, O., Hernando, G., Corradi, J., y Bouzat, C. (2018). Activation of *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive and mammalian nicotinic receptors by the antiparasitic bephenium. *Molecular Pharmacology*, 94(5). <https://doi.org/10.1124/mol.118.113357>
- Turina, A. del V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A., y Perillo, M. A. (2006). Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 122(2), 101–113. <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2006.02.007>
- Ultee, A., Kets, E. P. W., y Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606–4610. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4606-4610.1999/ASSET/D9AC1515-4DC1-47E4-A416-1F49A168559B/ASSETS/GRAPHIC/AM1090375005.JPEG>
- Unwin, N., y Fujiyoshi, Y. (2012). Gating Movement of Acetylcholine Receptor Caught by Plunge-Freezing. *Journal of Molecular Biology*, 422(5), 617–634. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2012.07.010>
- Van Hooft, J. A., Van Der Haar, E., y Vijverberg, H. P. M. (1997). Allosteric Potentiation of the 5-HT₃ Receptor-mediated Ion Current in N1E-115 Neuroblastoma Cells by 5-Hydroxyindole and Analogues. *Neuropharmacology*, 36(4–5), 649–653. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00045-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00045-2)
- Walstab, J., Rappold, G., y Niesler, B. (2010). 5-HT₃ receptors: Role in disease and target of drugs. *Pharmacology y Therapeutics*, 128(1), 146–169. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2010.07.001>
- Wetzel, C. H. R., Hermann, B., Behl, C., Pestel, E., Rammes, G., Zieglgänsberger, W., Holsboer, F., y Rupprecht, R. (1998). Functional Antagonism of Gonadal Steroids at the 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptor. *Molecular Endocrinology*, 12(9), 1441–1451. <https://doi.org/10.1210/MEND.12.9.0163>
- Yaakob, N. S., Nguyen, D.-T., Exintaris, B., y Irving, H. R. (2018). The C and E subunits of the serotonin 5-HT₃ receptor subtly modulate electrical properties of the receptor. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 97(September 2017), 1701–1709. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.010>
- Zhang, S., Banerjee, D., y Kuhn, J. R. (2011). Isolation and Culture of Larval Cells from *C. elegans*. *PLoS ONE*, 6(4), 19505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019505>

- Zhang, Y., Lu, H., y Bargmann, C. I. (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 438(7065), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature04216>
- Ziemba, P. M., Schreiner, B. S. P., Flegel, C., Herbrechter, R., Stark, T. D., Hofmann, T., Hatt, H., Werner, M., y Gisselmann, G. (2015). Activation and modulation of recombinantly expressed serotonin receptor type 3A by terpenes and pungent substances. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(4), 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.09.074>

PUBLICACIONES

1. **Rodriguez Araujo N[&], Fabiani C[&], Mazzarini Dimarco A, Bouzat C, Corradi J. "Orthosteric and Allosteric Activation of Human 5-HT_{3A} Receptors". *Biophysical Journal*. 2020; 119: 1670–1682. doi:10.1016/j.bpj.2020.08.029**
(& Primera autoría compartida)
2. **Rodriguez Araujo N, Hernando G, Corradi J, Bouzat C. "The nematode serotonin-gated chloride channel MOD-1: A novel target for anthelmintic therapy". *Journal of Biological Chemistry*. 2022; 298: 102356. doi:10.1016/J.JBC.2022.102356**
3. *Juan Facundo Chrestia, Ornella Turani, Noelia Rodriguez Araujo, Guillermina Hernando, María del Carmen Esandi and Cecilia Bouzat (2023). "Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by post-translational modifications". *Pharmacological Research* 106712. doi:10.1016/j.phrs.2023.106712.*

TRABAJOS EN PROCESO DE REVISIÓN

*Guillermina Hernando; Ornella Turani; Noelia Rodriguez Araujo; Cecilia Bouzat. "The diverse family of Cys-loop receptors in Caenorhabditis elegans: Insights from biophysical studies". *Biophysical Reviews*.*

TRABAJOS AVANZADOS EN PROCESO DE ENVÍO A PUBLICAR

1. **"Multitarget compounds from essential oils as novel anthelmintic drugs".**

Hernando G., Turani O., **Rodriguez Araujo N.**, Bouzat C. (2023).

2. “Unravelling the physiological role and molecular function of betaine-sensitive nicotinic receptors of *Caenorhabditis elegans*”.

Turani O., Hernando G., **Rodriguez Araujo N.**, Bouzat C. (2023).

3. “Drug repurposing strategy targeting serotonin-gated ion channels”.

Rodriguez Araujo Noelia; Hernando Guillermina; Bouzat Cecilia. (2023).