



Universidad Nacional del Sur

Tesis Doctoral en Biología

**Receptores *Cys-loop* de *Caenorhabditis elegans*:
búsqueda de nuevos fármacos**

ORNELLA TURANI

Bahía Blanca

Argentina

2020



Universidad Nacional del Sur

Tesis Doctoral en Biología

Receptores *Cys-loop* de *Caenorhabditis elegans*: búsqueda de nuevos fármacos

ORNELLA TURANI

Bahía Blanca

Argentina

2020

Directora de Tesis

DOCTORA CECILIA BOUZAT

Profesora Asociada de Farmacología II en la Universidad Nacional del Sur

Investigadora Superior de CONICET

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, 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 período comprendido entre el primero de Abril del 2016 al primero de Diciembre del 2020, bajo la dirección de la Doctora Cecilia Bouzat, Profesora Asociada de la cátedra de Farmacología II e Investigadora Superior de CONICET.

Turani Ornella
Diciembre de 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Sur por brindarme la posibilidad de formarme académicamente con un excelente nivel y de manera gratuita, tanto en mis estudios de grado como de posgrado. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo económico y al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) por brindarme el lugar para poder realizar mi Tesis Doctoral.

A mi directora, Dra. Cecilia Bouzat, por permitirme desarrollar la Tesis en el laboratorio y crecer académicamente. Por dirigirme durante estos años brindándome su ayuda, paciencia y apoyo constante.

A mis compañeros del laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular del INIBIBB. A Guille e Ignacio por enseñarme a trabajar con *C. elegans* y por su paciencia. A Jere, Albano, Noe, Facu, Eli y Carmen por su ayuda y consejos, por generar un ambiente de trabajo muy cálido y cómodo. A Mati y Juli, que, si bien hoy no están en el laboratorio, fueron muy importantes durante el desarrollo de mi Tesis. A Ari, por escucharme y aconsejarme, tanto en lo académico como lo personal.

A mi amiga Cami por ir “juntas a la par” desde el 2010, cuando recién empezábamos la carrera. Por compartir todo y hacer más lindo el recorrido.

A todos los integrantes del INIBIBB, becarios, investigadores y personal de apoyo, por su amabilidad y predisposición durante estos años.

A los “Pseudobiólogos”, por compartir el amor por la Biología, por hacerme reír siempre y por ser tan buenos amigos.

A mis amigas de la vida, Ampí, Rosi y Flor, por escucharme hablar sobre mi trabajo sin entender mucho, pero igual apoyarme y acompañarme siempre. Por alegrarse de mis logros e incentivarme a seguir.

A mi familia, mi mamá Mirna, mi papá Claudio y mi hermana Giuli, por su apoyo y amor incondicional. Por estar orgullosos de mí y demostrármelo constantemente. A mis abuelos, tíos y primos por estar siempre presentes.

A Juan por su paciencia infinita, por escucharme, ayudarme y acompañarme siempre en todo. Por brindarme herramientas claves para desarrollarme y crecer en diferentes ámbitos de la vida.

Diciembre de 2020

Turani Ornella

RESUMEN

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre utilizado como organismo modelo en diferentes disciplinas de la ciencia. Su tamaño reducido, plan corporal anatómicamente simple, ciclo de vida corto y amplio repertorio de comportamientos, lo han transformado en un organismo muy útil en investigación. Además, emerge como un modelo de interés en la industria farmacéutica para realizar ensayos *in vivo* rápidos y económicos, y para la detección de compuestos con actividad biológica.

C. elegans comparte características fisiológicas y farmacológicas con nematodos parásitos y además es sensible a la mayoría de las drogas antiparasitarias que se utilizan en el hombre y en los animales. Dado que es difícil trabajar con nematodos parásitos en el laboratorio, *C. elegans* ha emergido como un excelente modelo de nematodo parásito y ha contribuido al conocimiento de los mecanismos de acción de diversos fármacos.

C. elegans cuenta con la mayor familia de receptores *Cys-loop*. En sus músculos, posee tres receptores *Cys-loop* principales: dos receptores nicotínicos (nAChRs), el L-AChR y el N-AChR, y el receptor de GABA, UNC-49. Los nAChRs median la contracción de los músculos de la pared del cuerpo mientras que los receptores de GABA median la relajación muscular, permitiendo el movimiento sinusoidal típico del nematodo.

Estos receptores son los blancos moleculares de drogas antihelmínticas. El levamisol, actuando como agonista del L-AChR, genera contracción sostenida de los músculos y finalmente la parálisis espástica del nematodo. La piperazina, actuando como agonista de los receptores de GABA, genera relajación muscular y parálisis flácida.

Otros receptores *Cys-loop* presentes en el nematodo también son blancos de fármacos antihelmínticos. El receptor de glutamato permeable a cloruro (GluCl) presente en neuronas y células musculares es el blanco molecular de la ivermectina (IVM), uno de los antiparasitarios más utilizados a nivel mundial.

En cuanto a los receptores *Cys-loop*, *C. elegans* no es más diferente a los nematodos parásitos de lo que cada especie individual de parásito lo es de otra. Esto se evidencia en la amplia diversidad de subunidades que generan receptores *Cys-loop* con diferente composición y propiedades farmacológicas en los nematodos y cuyas bases moleculares no se comprenden completamente.

En esta Tesis se utilizó a *C. elegans* como modelo de nematodo parásito. Se estudiaron las propiedades antihelmínticas y los blancos de acción de diferentes compuestos químicos a través de ensayos de comportamiento. Para determinar sus mecanismos de acción se realizaron registros electrofisiológicos de corrientes unitarias y macroscópicas sobre receptores presentes en células musculares de *C. elegans* o expresados heterológicamente en células de mamífero.

En el **Capítulo 1** se estudió el befenio, un antihelmíntico colinérgico cuyo modo de acción no se conocía completamente. Mediante ensayos de comportamiento se determinó que befenio genera parálisis espástica en nematodos salvajes adultos jóvenes. Utilizando cepas mutantes se determinó que el L-AChR es el blanco molecular involucrado en la actividad paralizante de befenio. Estos resultados sugieren que no existiría un receptor específico para befenio en los músculos de *C. elegans*. Cuando befenio fue combinado con levamisol el efecto paralizante fue aditivo. Esto es de importancia ya que la combinación de drogas es una buena estrategia para reducir la resistencia en nematodos parásitos.

A nivel molecular, mediante registros de canal único, se determinó que befenio activa el L-AChR de *C. elegans* tanto en larvas L1 como L2, y a mayores concentraciones, actúa como un bloqueador de canal abierto de dicho receptor. Los estudios de *docking* molecular mostraron que befenio se une al sitio de unión ortostérico del agonista y forma las interacciones cation- π requeridas para la activación del receptor. Estos resultados podrían explicar la alta eficacia para activar el L-AChR.

La selectividad de befenio por el nAChR muscular de mamífero fue estudiada mediante registros de canal único y de corrientes macroscópicas. Se determinó que befenio activa el nAChR pero actúa como un agonista muy débil y un bloqueador de canal potente. Según estudios de *docking* molecular, befenio generaría las interacciones necesarias para la activación solamente en uno de los dos sitios ortostéricos del receptor. Esto explicaría su baja eficacia en receptores de mamífero con respecto a los receptores de nematodos.

Cepas mutantes de *C. elegans* que carecen de la subunidad LEV-8 podrían contener L-AChRs formados por la subunidad ACR-8 en su reemplazo. Estos L-AChRs imitan un receptor de nematodo parásito, como el receptor de *H. contortus*, cuya subunidad ACR-8 podría mediar la actividad de befenio. Mediante ensayos de comportamiento con la cepa mutante se determinó que la subunidad ACR-8 no es requerida para el efecto paralizante de befenio en *C. elegans*. A nivel de canal único, los receptores que carecen de la subunidad LEV-8 también fueron activados por befenio y dicha droga, al igual que ACh, indujo una rápida desensibilización del receptor.

En el **Capítulo 2** se estudiaron tres terpenoides, carvacrol, timol y eugenol, presentes en plantas. Mediante ensayos de comportamiento utilizando nematodos salvajes, se determinó que los terpenoides paralizan rápidamente a *C. elegans*. El orden de potencia de parálisis fue: carvacrol>timol>eugenol. Las larvas fueron más sensibles que los nematodos adultos jóvenes. Además, los compuestos inhibieron irreversiblemente la eclosión de los huevos con el mismo orden de potencia. Estos hallazgos indican que los terpenoides producen efectos antihelmínticos a corto y largo plazo.

Se evaluaron tres combinaciones de drogas: timol/levamisol, timol/piperazina y timol/ivermectina. El efecto paralizante de la combinación timol/levamisol fue sinérgico y dicha combinación también fue efectiva en la inhibición de la eclosión de huevos.

Mediante ensayos de comportamiento con nematodos mutantes se determinó que los L-AChRs y los receptores de GABA son los blancos moleculares de los terpenoides. Los registros de corrientes macroscópicas revelaron que los compuestos no son capaces de activar los receptores, pero inhiben las corrientes evocadas por los agonistas. En registros de canal único, los terpenoides disminuyeron la actividad de L-AChRs generada por ACh y levamisol, redujeron la frecuencia de aperturas del L-AChR e indujeron un componente de estado cerrado más prolongado. Sin embargo, no afectaron las propiedades del canal como la conductancia y la duración de apertura. El análisis global indicó que los terpenoides ejercen su efecto antihelmíntico actuando como antagonistas no competitivos del L-AChR.

En el **Capítulo 3** se estudió la doxepinona, considerada una estructura química privilegiada. Mediante ensayos de comportamiento se demostró que la doxepinona ejerce su acción paralizante sobre nematodos salvajes adultos jóvenes actuando a través el GluCl, el blanco molecular de la IVM. Este compuesto sintético generó parálisis estacionaria en nematodos salvajes.

La IVM actúa sobre GluCls presentes en la faringe del nematodo e inhibe el bombeo faríngeo. Doxepinona también redujo la velocidad de bombeo faríngeo en nematodos salvajes y el efecto fue mediado por los GluCls.

Mediante registros de corrientes macroscópicas se caracterizaron las corrientes del receptor heteromérico GluCl α 1/GluCl β de *C. elegans* evocadas por el agonista glutamato. Se determinó que la doxepinona no es un agonista de dicho receptor ya que no es capaz de activarlo. Mediante diferentes protocolos de aplicación de drogas, se determinó que la

doxepinona actúa como un inhibidor alostérico de los GluCl. Se propuso a la inhibición del GluCl como un nuevo mecanismo antihelmíntico.

En resumen, en esta Tesis Doctoral, utilizando a *C. elegans* como modelo de nematodo parásito, se identificaron los sitios y se descifraron los mecanismos de acción molecular de diferentes compuestos químicos, con actividad antihelmíntica.

SUMMARY

Caenorhabditis elegans is a free-living nematode used as a model organism in different science disciplines. Its reduced size, anatomically simple body plan, short life cycle and broad repertoire of behaviours have turned it in a useful organism for research. It also emerges as an interesting model in the pharmaceutical industry for fast and cheap in vivo assays and for the detection of compounds with biological activity.

C. elegans shares pharmacological and physiological characteristics with parasitic nematodes and is sensitive to most antiparasitic drugs used in humans and animals. Given that parasitic nematodes are difficult to work with in the laboratory, *C. elegans* has emerged as an excellent parasitic model and has contributed to the understanding of mechanisms of action of anthelmintic drugs.

C. elegans has the largest *Cys-loop* receptor family. In its muscle, it has three main *Cys-loop* receptors: two nicotinic receptors (nAChRs), L-AChR and N-AChR, and the UNC-49 GABA receptor. nAChRs mediate body wall muscle contraction while GABA receptors mediate muscle relaxation, thus allowing the typical sinusoidal movement of the nematode.

These receptors are the molecular targets of anthelmintic drugs. Levamisole, acting as an L-AChR agonist, generates sustained muscle contraction which ends in spastic paralysis of the nematode. Piperazine, by acting as an agonist of GABA receptors, generates muscle relaxation and flaccid paralysis.

Other *Cys-loop* receptors in the nematode are also targets of anthelmintic drugs. The glutamate-activated chloride channel (GluCl) present in neurons and muscle cells is the molecular target of ivermectin (IVM), which is one of the most used antiparasitic drug worldwide.

Considering *Cys-loop* receptors, *C. elegans* is no more dissimilar to parasitic nematodes than each individual species of parasite is to another. This results from the wide subunit diversity that generates *Cys-loop* receptors with different compositions and pharmacological properties among nematodes; the molecular basis of this diversity remains not fully understood.

In this Thesis, *C. elegans* was used as parasitic nematode model. The anthelmintic properties and molecular targets of different chemical compounds were studied through behavioural assays. To determine their mechanisms of action, electrophysiological recordings,

single-channel and macroscopic current recordings, were carried out in *C. elegans* muscle cells or in mammalian cells heterologously expressing the receptor under study.

In **Chapter 1** buphenium was studied. It is a cholinergic anthelmintic drug whose mechanism of action was not fully understood. Through behavioural assays it was determined that buphenium generates spastic paralysis in young adult wild-type worms. By using different mutant strains, it was determined that L-AChR is the molecular target involved in the paralyzing activity of buphenium. The results suggested that there may not be a specific receptor for buphenium in *C. elegans* muscle. When buphenium was combined with levamisole, the paralyzing effects were additive; which is of significance since drug combination is a good strategy to reduce resistance in parasitic nematodes.

At the molecular level, through single channel recordings, it was determined that buphenium activates L-AChR in larvae L1 and L2 *C. elegans*. At higher concentrations, it acted as an L-AChR open channel blocker. Molecular docking studies showed that buphenium binds to the orthosteric agonist binding site and forms the cation- π interactions required for receptor activation. This result may explain the high efficacy for L-AChR activation.

Buphenium selectivity for the mammalian muscle nAChR was studied through single-channel and macroscopic current recordings. Buphenium activated nAChRs, but it acted as a very weak agonist and a potent channel blocker. According to the molecular docking studies, buphenium would generate the necessary interactions for activation only in one of the two orthosteric sites of the receptor. This may explain the low efficacy in the mammalian receptor with respect to nematode receptors.

C. elegans mutant strains that lack LEV-8 subunit may have L-AChRs containing the spare ACR-8 subunit in its replacement. These L-AChRs may mimic those in certain nematode parasites, like the *H. contortus* receptor, for which it was suggested that its ACR-8 subunit may mediate buphenium activity. Through behavioural assays in the mutant strain, it was determined that the ACR-8 subunit is not required for the paralyzing effects of buphenium on *C. elegans*. At the single channel level, the receptors that lack LEV-8 subunit were similarly activated by buphenium. Buphenium, like ACh, induced fast receptor desensitization.

In the **Chapter 2** terpenoids present in plants (carvacrol, thymol and eugenol) were studied. Through behavioural assays in wild-type nematodes, it was determined that terpenoids produced fast paralysis of the worms. The paralyzing potency order was: carvacrol > thymol > eugenol. The larvae were more sensitive than young adults. Also, the compounds irreversibly

inhibited egg hatching with the same potency order. These findings indicate that terpenoids generate short- and long-term anthelmintic effects.

Three drug combinations were evaluated: thymol/levamisole, thymol/piperazine and thymol/ivermectin. The paralyzing effect of thymol/levamisole combination was synergic, and this combination was effective in the inhibition of egg hatching too.

Through behavioural assays in mutant nematodes, it was determined that L-AChRs and GABA receptors are the molecular targets of the terpenoids. The macroscopic current recordings revealed that the compounds could not activate the receptors but inhibited the currents evoked by the agonists. In single channel recordings, terpenoids reduced L-AChR activity generated by ACh and levamisole, reduced the frequency of L-AChR openings and induced a longer closed state component. However, terpenoids did not affect channel properties, such as conductance and open duration. The global analysis indicated that, terpenoids exert their anthelmintic effect, acting as L-AChR non-competitive antagonists.

In the **Chapter 3**, doxepinone was studied. Doxepinone is considered a privileged chemical structure. Through behavioural assays, it was demonstrated that doxepinone exert the paralyzing action in wild-type young adult worms acting through GluCl_s, which are the molecular targets of IVM. The synthetic compound generated stationary paralysis on wild-type worms.

IVM acts on nematode pharyngeal GluCl_s and inhibits pharyngeal pumping. Doxepinone also reduced the pharyngeal pumping rate in wild-type worms and the effect was mediated by GluCl_s.

Through macroscopic current recordings, the responses of GluCl_{α1}/GluCl_β receptors of *C. elegans* evoked by the agonist glutamate were characterized. It was determined that doxepinone is not a GluCl agonist because it is not capable of activating the receptor. Through different drug application protocols, it was determined that doxepinone acts as an allosteric inhibitor of GluCl_s. The inhibition of GluCl_s was proposed as a new anthelmintic mechanism.

In summary, in this Doctoral Thesis, using *C. elegans* as a model of parasitic nematode, the target sites and mechanisms of action of different chemical compounds with anthelmintic activity were deciphered.

INDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	V
INTRODUCCIÓN	1
Filo Nematoda	1
Nematodos parásitos	2
<i>C. elegans</i>: Organismo modelo utilizado en investigación	3
<i>C. elegans</i>: Modelo de nematodo parásito	5
Descripción detallada de <i>C. elegans</i>	6
Ciclo de vida	6
Características anatómicas y morfológicas	7
Locomoción de <i>C. elegans</i>	11
Sinapsis	13
Receptores <i>Cys-loop</i>	14
Receptores nicotínicos: prototipo de LGICs	14
1. Modulación del receptor por ligandos alostéricos	18
2. Activación de los nAChRs	19
Receptores <i>Cys-loop</i> de <i>C. elegans</i>	20
1. Receptores nicotínicos	21
2. Receptor de GABA	23
3. Receptor de glutamato	24
4. Receptor de serotonina	25
Antihelmínticos	26
Resistencia a drogas antihelmínticas	29
MATERIALES Y METODOS	31
Cepas de <i>C. elegans</i> utilizadas	32
Cultivo y mantenimiento de <i>C. elegans</i>	33
Transferencia de nematodos en placas NGM	34
Obtención de cultivos sincronizados	34
Stock de nematodos	35
Ensayos de comportamiento	36
Ensayo de movilidad en medio líquido	36
Ensayo de parálisis en placa de agar	37
1. Determinación de relaciones dosis-efecto	37
2. Longitud relativa del cuerpo	38
Ensayo de eclosión de huevos	38
Ensayo de velocidad de bombeo faríngeo	39
Aislamiento y cultivo de células	39
Células embrionarias	39
Células correspondientes al estadio larval L2	40
Cultivo de células de mamífero BOSC 23	41
Expresión heteróloga de receptores	42
1. Receptor nicotínico de acetilcolina muscular	42

2. Canal de cloruro activado por glutamato	42
Registros de "Patch-Clamp"	42
Registros de canal único (corrientes unitarias)	43
1. Determinación de la conductancia del canal	44
2. Obtención de k_{+b} (velocidad de bloqueo del canal)	45
Registros de corrientes macroscópicas	45
1. Curva de corriente macroscópica-voltaje	47
2. Protocolos de aplicación de drogas	47
Modelado molecular y docking	48
Microscopía	48
Drogas	49
Estadística	49
<hr/>	
CAPITULO I: ACCIONES MOLECULARES DEL ANTIPARASITARIO BEFENIO SOBRE EL RECEPTOR NICOTÍNICO SENSIBLE A LEVAMISOL DE CAENORHABDITIS ELEGANS Y EL RECEPTOR NICOTÍNICO MUSCULAR DE VERTEBRADOS	50
Introducción	51
Objetivos	53
Desarrollo y Resultados	54
Efectos de befenio en el comportamiento de <i>C. elegans</i>	54
Identificación del blanco molecular de acción mediante <i>screening</i> con nematodos mutantes	55
La subunidad ACR-8 del L-AChR de <i>C. elegans</i> no mediaría la sensibilidad a befenio	56
Efecto paralizante de la acción de drogas combinadas	57
Befenio activa L-AChRs de las células musculares de larvas L1 de <i>C. elegans</i>	58
Caracterización de befenio como agonista y bloqueador de canal abierto de L-AChRs	61
El L-AChR es el blanco molecular de befenio en el estadio larval L2 de desarrollo	64
Befenio es un agonista débil y un bloqueador potente del nAChR muscular de mamífero	66
1. Efecto de befenio sobre canales activados por ACh	68
2. Registros de corrientes macroscópicas activadas por befenio	70
Estudios <i>in silico</i> : befenio se une al sitio de unión de ACh	70
Discusión	73
<hr/>	
CAPITULO II: RECEPTORES CYS-LOOP MUSCULARES DE CAENORHABDITIS ELEGANS COMO BLANCOS MOLECULARES DE TERPENOIDES CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA	82
Introducción	83
Objetivos	86
Desarrollo y Resultados	87
Los terpenoides -timol, carvacrol y eugenol- paralizan rápidamente a <i>C. elegans</i>	87
1. Características de la parálisis inducida por los terpenoides	89
2. Sensibilidad a los terpenoides en diferentes estadios de desarrollo de <i>C. elegans</i>	89
Los terpenoides afectan la eclosión de los huevos de <i>C. elegans</i>	90

El L-AChR y el receptor UNC-49 son los blancos moleculares involucrados en la parálisis generada por los terpenoides	92
1. El N-AChR tiene un rol en la parálisis generada por los terpenoides	95
2. Los GluCl α s y los receptores de serotonina no están involucrados en la parálisis generada por los terpenoides	96
Quimioterapia combinada: timol junto con drogas antihelmínticas clásicas	98
Efectos de la combinación de drogas sobre la eclosión de huevos	101
Los terpenoides no son capaces de activar al L-AChR ni al receptor UNC-49	101
Los terpenoides inhiben las corrientes macroscópicas provenientes de la activación de L-AChRs y de los receptores UNC-49	103
Los terpenoides disminuyen la actividad de canal único de los L-AChRs generada por ACh y levamisol	104
Los terpenoides no modifican las propiedades del L-AChR activado por ACh pero generan un componente de estado cerrado prolongado	106
Timol no afecta la conductancia de canal único del L-AChR activado por ACh	108
Los terpenoides generan una reducción en la frecuencia de aperturas del L-AChR	109
Timol actúa como un antagonista competitivo del L-AChR	109
Discusión	111
<hr/>	
CAPITULO III: UN NUEVO ANTAGONISTA DE LOS CANALES DE CLORURO ACTIVADOS POR GLUTAMATO DE CAENORHABDITIS ELEGANS CON ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA	119
Introducción	120
Objetivos	126
Desarrollo y Resultados	127
Efectos de la doxepinona en <i>C. elegans</i>	127
Los GluCl α s están involucrados en los efectos rápidos de la doxepinona	128
Caracterización de la parálisis generada por doxepinona	132
Los mutantes que carecen de GluCl α s son resistentes a ivermectina	133
Doxepinona reduce la velocidad de bombeo faríngeo	134
Caracterización molecular de GluCl α s heteroméricos GluCl α 1/GluCl β	136
1. Doxepinona no actúa como agonista de GluCl α s	138
2. Doxepinona inhibe los GluCl α s de <i>C. elegans</i>	138
Discusión	143
<hr/>	
CONCLUSIONES GENERALES	149
<hr/>	
ABREVIATURAS	152
<hr/>	
BIBLIOGRAFIA	155
<hr/>	
PUBLICACIONES	170

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las infestaciones por parásitos, también llamadas parasitosis, afectan a una gran cantidad de especies animales y vegetales. Tienen un impacto negativo sobre la salud humana y generan importantes pérdidas económicas al afectar al ganado y a diversos cultivos. La disponibilidad de fármacos antihelmínticos es limitada y su desarrollo escaso. Además, los nematodos han desarrollado resistencia a las drogas de uso común, por lo tanto, es fundamental la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos que permitan combatir esta problemática.

Los nematodos parásitos no son animales ideales para trabajar en un laboratorio debido a sus complejos ciclos de vida y a la necesidad de disponer del hospedador específico, entre otras cosas. Por ello en esta Tesis se utilizó al nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* como modelo de nematodo parásito. Este organismo es fácil de utilizar, económico y puede ser manipulado mediante técnicas de genética molecular, lo cual lo hace muy útil en investigación. Además, posee una gran familia de receptores *Cys-loop* que en nematodos parásitos son blancos de drogas antihelmínticas.

C. elegans fue utilizado como plataforma para identificar nuevos compuestos con potencial actividad antiparasitaria. Se llevaron a cabo tanto estudios de comportamiento como electrofisiológicos con el objetivo de comprender en detalle los mecanismos moleculares y los receptores *Cys-loop* involucrados en la actividad antihelmíntica de los diversos compuestos.

Por un lado, se estudió el befenio, una droga antiparasitaria comercial cuyo mecanismo de acción no se conocía completamente. Por otro lado, se identificaron nuevos compuestos antihelmínticos partiendo de productos naturales, aceites esenciales de especies vegetales conteniendo terpenoides, y de un compuesto químico sintético conteniendo una estructura privilegiada responsable de su actividad biológica.

Filo Nematoda

Los nematodos, también llamados nematelmintos incluyen algunos de los organismos más ubicuos y numerosos de todos los animales pluricelulares. Los nematodos de vida libre están presentes en el mar, agua dulce y suelo. Se encuentran en todos los ambientes, desiertos, altas montañas y profundidades oceánicas, como así también en todos los climas disponibles, desde las regiones polares a los trópicos. Dentro de este Filo también existen numerosos nematodos parásitos que afectan a diversos organismos (Ruppert y Barnes, 1996).

El Filo Nematoda es parte de un grupo mayor, el Clado Ecdysozoa. Este Clado contiene organismos que cambian su cutícula mediante mudas o ecdisis (Corsi et al., 2015). El Filo posee

dos Clases: Adenophorea o Aphasmda y Secernentea o Phasmida (Ruppert y Barnes, 1996). Esta última contiene al Orden Rhabditida donde está incluido el género *Caenorhabditis*. Si bien todas las especies *Caenorhabditis* conocidas son de vida libre, Rhabditida incluye parásitos de plantas y animales como así también especies de vida libre (Corsi et al., 2015).

Nematodos parásitos

Muchos nematodos son parásitos y exhiben diferentes grados de parasitismo, lo cual los convierte en organismos de importancia económica o médica ya que afectan a plantas y animales, incluido el hombre. Los parásitos más relevantes que generan un gran impacto en la salud humana y animal pueden organizarse en dos grandes categorías, que a su vez poseen diferentes grupos, tal como se muestra en la Tabla 1 (Ruppert y Barner, 1996).

Categorías	Grupos	Representantes	A quién afecta	Dónde se alojan los parásitos adultos	Hospedador intermedio	Enfermedad
Un único hospedador. Adultos de ambos sexos infectivos. Transmisión por huevos o juveniles.	Tricostrongilidos	<i>Haemonchus contortus</i>	ganado	abomaso	-	hemoncosis
	Ascaroides	<i>Ascaris lumbricoides</i>	humanos	intestino	-	ascariasis
		<i>Ascaris suum</i>	cerdos	intestino	-	ascariasis
		<i>Toxocara canis</i>	perros y otros cánidos	intestino	-	toxocariasis
		<i>Toxocara cati</i>	gatos y otros félidos	intestino	-	toxocariasis
	Uncinarias	<i>Necator americanus</i>	humanos y animales	intestino	-	necatoriasis
	Oxiúridos	<i>Enterobius vermicularis</i>	humanos (niños)	intestino (colon)	-	oxiuriasis (enterobiasis)
Triquineloides	<i>Trichinella spiralis</i>	mamíferos	intestino delgado	-	triquinelosis, triquinosis o triquiniasis	
Un hospedador intermedio donde se	Filarias	<i>Wuchereria bancrofti</i>	humanos	glándulas linfáticas y otros tejidos	insectos hematófagos (mosquitos)	filariasis linfática (elefantiasis)

desarrolla el juvenil. Un hospedador definitivo donde ocurre la reproducción.		<i>Loa loa</i>	humanos	tejido subcutáneo	insectos hematófagos (moscas)	filariasis de piel y del ojo (loiasis)
		<i>Dirofilaria immitis</i>	perros, lobos y zorros	corazón y arterias pulmonares	insectos hematófagos (mosquitos)	dirofilariasis canina
	Dracunculoides	<i>Dracunculus medinensis</i>	hombre	tejido subcutáneo	copépodo	dracunculiasis

Tabla 1: Principales nematodos parásitos que afectan al hombre y a diversos animales. Clasificación en dos categorías principales, grupos que integran cada categoría y sus especies representantes. También se detallan los hospedadores, el lugar donde se alojan los parásitos adultos y la enfermedad que ocasionan (Ruppert y Barnes, 1996).

C. elegans: Organismo modelo utilizado en investigación

El Filo Nematoda también cuenta con muchas especies de vida libre, y *C. elegans* es una de ellas. Este nematodo está presente en todo el mundo, principalmente en climas templados. Si bien es considerado un organismo que habita el suelo, también puede ser aislado de materia vegetal en descomposición ya que, al contar con una gran cantidad de bacterias, el nematodo las utiliza como fuente de alimento (Corsi et al., 2015). Este organismo fue caracterizado como nematodo por primera vez por Émile Maupas en 1900. En 1965 Sydney Brenner lo implementó como modelo genético para comprender interrogantes de la biología del desarrollo y la neurobiología (Politz y Philipp, 1992), y desde entonces es ampliamente utilizado como organismo modelo.

C. elegans fue el primer organismo multicelular eucariota cuyo genoma pudo ser completamente secuenciado. Esto ha permitido identificar genes asociados al desarrollo y a procesos biológicos celulares, lo cual ha generado importantes avances en el conocimiento científico. Como la evolución ha mantenido conservados muchos genes que tienen funciones similares, y en algunos casos idénticas en nematodos y en otros animales incluidos los humanos, la investigación centrada en el nematodo de vida libre permite comprender mecanismos genéticos moleculares presentes en todos los animales (Carroll et al., 2004; Corsi et al., 2015).

Por otro lado, técnicas muy útiles fueron desarrolladas en este nematodo y luego adaptadas y aplicadas a otros sistemas biológicos. Por ejemplo, las estrategias utilizadas para la clonación del genoma, el silenciamiento de genes por ARN de interferencia y la proteína

fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) como marcador biológico (Corsi et al., 2015).

C. elegans es un importante sistema modelo para la investigación biológica en muchos campos como genómica, biología celular, neurociencias y envejecimiento, ya que cuenta con varias ventajas (Corsi et al., 2015):

- Es muy pequeño, las larvas recién eclosionadas tienen un tamaño de 0,25 mm de largo y los adultos miden aproximadamente 1 mm, por lo tanto, puede crecer y ser mantenido en un espacio muy reducido. En el laboratorio crece en placas de Petri con agar o en medio de cultivo líquido, en ambos casos con *E. coli* como fuente de alimento.

- Es transparente, lo cual permite visualizar sus células y detalles subcelulares fácilmente.

- En condiciones óptimas, su ciclo de vida es muy rápido. A 25 °C el nematodo se desarrolla de huevo a adulto grávido en tres días. Además, su desarrollo puede ser controlado modificando la temperatura del ambiente.

- La mayoría son hermafroditas auto-fecundantes, es decir que a partir de un solo nematodo puede obtenerse una gran población.

- Su genoma está completamente secuenciado lo cual ha acelerado el clonado y análisis funcional de subunidades de canales iónicos activados por ligandos (*Ligand-Gated Ion Channels*, LGICs) permitiendo el entendimiento de estas moléculas que actúan como blancos de drogas antihelmínticas (Brown et al., 2006).

- El plan corporal de los adultos es anatómicamente simple con aproximadamente 1000 células somáticas. Tanto el número de células que posee como su forma de desarrollo no varían. Se conoce el linaje celular completo como así también la conectividad de las 302 neuronas presentes en un adulto hermafrodita.

- Presenta un repertorio amplio de comportamientos: locomoción, búsqueda de comida, alimentación, defecación, puesta de huevos, formación de larva *dauer*, respuestas sensoriales, olfato, gusto y temperatura, y algunos comportamientos complejos como la cópula en los machos, comportamientos sociales, aprendizaje y memoria (Rankin, 2002; De Bono, 2003).

- No se necesita un equipamiento costoso para trabajar con dicho organismo. Los costos de mantenimiento son relativamente bajos y es fácil de cultivar en el laboratorio. Puede ser sincronizado mediante el tratamiento de adultos grávidos con una solución de hipoclorito de

sodio. Para tener un *stock* disponible, puede ser crio-preservedo por mucho tiempo (años) y volver a ser viable cuando sea necesario.

C. *elegans*: Modelo de nematodo parásito

C. elegans puede ser utilizado como modelo de nematodo parásito para el descubrimiento de nuevas drogas, y para identificar blancos moleculares y formas de resistencia ya que, si bien existen diferencias moleculares entre las distintas especies del Filo Nematoda, este nematodo de vida libre no es más diferente a los nematodos parásitos de lo que cada especie individual de parásito lo es de otra (Holden-Dye y Walker, 2007).

Comparte muchas características fisiológicas y farmacológicas con nematodos parásitos. Por ejemplo, al comparar a uno de los principales nematodos parásitos utilizados en investigación, *Ascaris suum*, con *C. elegans*, se vio que el diagrama de conexiones del sistema neuromuscular es similar (Angstadt et al., 1989). Lo mismo sucedió con los principales neurotransmisores, ACh en las motoneuronas excitatorias (Johnson y Stretton, 1985), GABA en las motoneuronas inhibitorias (Johnson y Stretton, 1987), y los *inputs* provistos por glutamato sobre motoneuronas (Davis, 1998). También existen similitudes con el parásito *Haemonchus contortus*, muchos de los neuropéptidos son idénticos o muy similares a los de *C. elegans* (Gaery et al., 1999; Li, 2005).

Otra característica que lo hace un buen modelo de nematodo parásito es que es sensible a la mayoría de las drogas antihelmínticas usadas para tratar infecciones parasitarias en el hombre y en el ganado (Jones et al., 2005; Neveu et al., 2010).

Además, muchos de los receptores que intervienen en la movilidad, y en particular el receptor nicotínico muscular sensible a levamisol (L-AChR) que ha sido estudiado en esta Tesis, presentan un funcionamiento molecular y sensibilidad a fármacos antihelmínticos muy semejantes a los de parásitos (Harrow y Gratton, 1985; Martin et al., 1996; Levandoski et al., 2005; Qian et al., 2006; Rayes et al., 2007).

C. elegans fue esencial para definir el modo de acción de muchas drogas antihelmínticas y puede contribuir a comprender los diversos mecanismos de resistencia. Por lo tanto, el nematodo de vida libre fue y continuará siendo un sistema modelo de nematodos parásitos para comprender el modo de acción de los antihelmínticos (Holden-Dye y Walker, 2007).

Descripción detallada de *C. elegans*

Ciclo de vida

Como puede observarse en la Figura 1, el ciclo de vida de *C. elegans* comprende un estadio embrionario que se lleva a cabo dentro del huevo. Parte del desarrollo ocurre dentro del adulto hermafrodita y luego continúa en el ambiente. De los huevos eclosionan las larvas L1 que posteriormente atraviesan diferentes estadios larvales (L2-L4) hasta llegar a un estadio adulto, capaz de generar progenie y comenzar nuevamente el ciclo. El fin de cada estadio larval está determinado por una muda, es decir una nueva cutícula es sintetizada y reemplaza a la vieja. Durante ese periodo el bombeo faríngeo cesa y el animal ingresa en un breve letargo (Altun y Hall, 2009a).

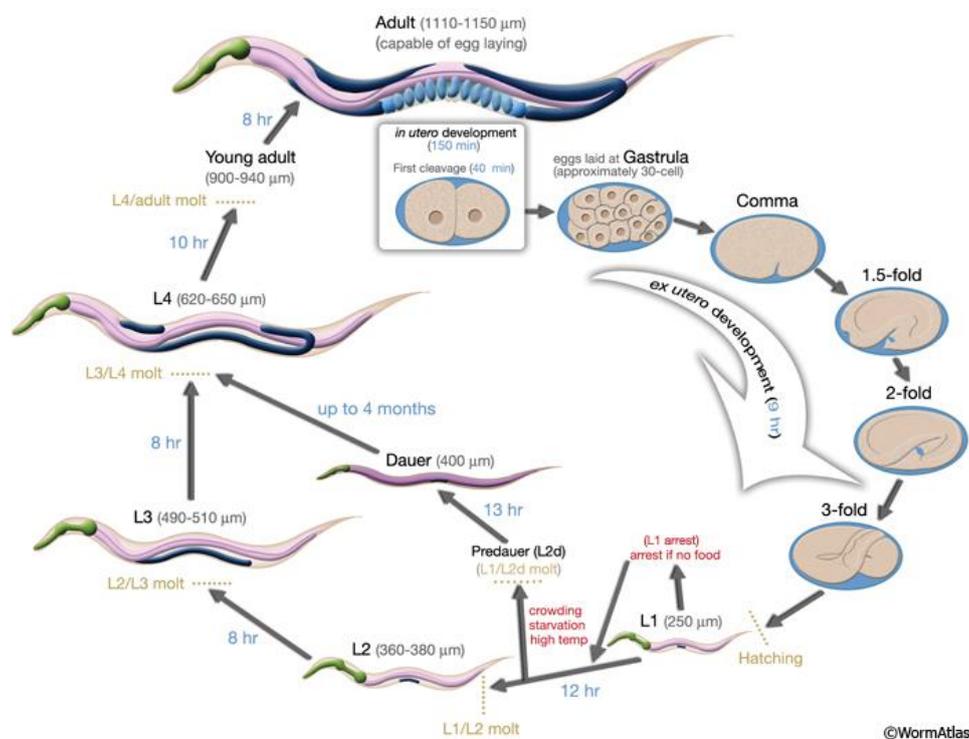


Figura 1: Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. Los números en azul indican el período de tiempo que el animal pasa en un determinado estadio, y las medidas en micrómetros (µm) corresponden a la longitud corporal en cada estadio. El ciclo comienza con la fertilización a los 0 min, la primera división ocurre 40 min más tarde. Los huevos son colocados en el exterior 150 min luego de la fertilización y en un estadio de gástrula (Imagen tomada de *WormAtlas*).

Cuando las condiciones ambientales no son favorables para el crecimiento, por ejemplo, ante la ausencia de alimento, la presencia de una feromona que indica densidad poblacional o altas temperaturas, las larvas L2 pueden llevar a cabo un ciclo de vida diferente y mudar a un estadio larval alternativo llamado larva "dauer" (en alemán, resistente). Esta larva es muy fina

y tiene una cutícula gruesa y alterada que sella la cavidad bucal. Esto impide al nematodo alimentarse, el desarrollo se detiene, y la locomoción también se reduce marcadamente. Puede sobrevivir varias semanas en dicho estadio y cuando las condiciones vuelven a ser favorables muda, su cavidad bucal vuelve a ser funcional y continúa su desarrollo como larva L4 (Corsi et al., 2015).

La mayoría son hermafroditas (XX) auto-fecundantes, pero también existen machos (X0) cuya presencia en la población es menos frecuente. Los hermafroditas pueden producir más de 300 huevos, pero si copulan con machos pueden generar una descendencia aún mucho mayor (Corsi et al., 2015).

Características anatómicas y morfológicas

El cuerpo de *C. elegans*, como el de todos los nematodos, es cilíndrico por ello se los llama gusanos redondos. Además, carece de segmentos, es delgado, alargado y los extremos se aguzan gradualmente (Figura 2) (Ruppert y Barnes, 1996). Está formado por una serie de tubos concéntricos, un tubo externo y uno interno separados por un espacio pseudo celómico lleno de fluido, conteniendo los principales órganos (Figura 3). El líquido de dicha cavidad está presurizado y funciona como un hidrostato. En la cavidad pseudo celómica existen células llamadas coelomocitos que actúan como “limpiadores”, comportándose como los macrófagos de vertebrados (Corsi et al., 2015).

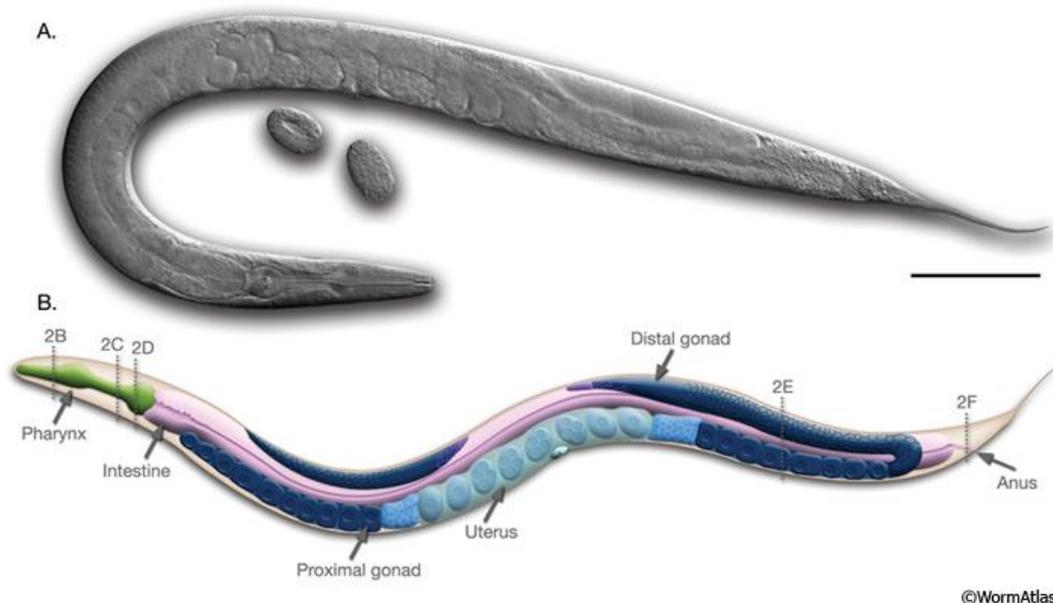


Figura 2: Anatomía de un nematodo hermafrodita adulto. A. Microscopía de Contraste de Interferencia Diferencial. Barra de escala: 0,1 mm. B. Esquema de las estructuras anatómicas, lado lateral izquierdo (Imagen tomada de *WormAtlas*).

El tubo externo o pared corporal consiste en la cutícula, hipodermis, sistema excretor, neuronas y músculo, y el tubo interno comprende la faringe, intestino y las gónadas en los adultos (Figura 3). Todos estos tejidos se encuentran bajo presión hidrostática regulada por un sistema osmoregulador (Altun y Hall, 2009a).

Epidermis (hipodermis): En los embriones la hipodermis se somete a una serie de fusiones celulares generando células epidermales multinucleadas o sinciciales. Estas células secretan la cutícula, una capa protectora de matriz extracelular especializada compuesta principalmente por colágenos, lípidos y glicoproteínas (Corsi et al., 2015) que recubre todo el cuerpo del nematodo por fuera, y reviste la faringe y el recto (Altun y Hall, 2009a).

La cutícula o exoesqueleto de la mayoría de los nematodos presenta un patrón de capas o zonas que difieren en su estructura y composición (Poltz y Philipp, 1992). Las cutículas correspondientes a cada estadio larval difieren en la expresión de proteínas, en el número de capas que la componen, en el espesor y en la composición (Lints y Hall, 2009).

Sistema nervioso: El sistema nervioso de un nematodo adulto hermafrodita contiene 302 neuronas que corresponden a dos sistemas nerviosos diferentes e independientes: el sistema nervioso somático (282 neuronas) y un pequeño sistema nervioso faringeal (20 neuronas). Estos sistemas están comunicados mediante un par de interneuronas (Robertson y Martin, 1993; Altun y Hall, 2011). El sistema nervioso somático está formado por un cordón nervioso ventral y un cordón nervioso dorsal, ambos originados en el anillo nervioso circunfaringeal (Figura 3). Los cuerpos celulares de las neuronas motoras se encuentran en el cordón ventral y los axones de las mismas forman el cordón dorsal (Hall y Altun, 2008). Los procesos neuronales pasan desde un nervio longitudinal hacia otro a través de rutas dorsoventrales, creando tractos circunferenciales llamados comisuras que se encuentran en la cabeza, en el cuerpo y en la cola del nematodo (Altun y Hall, 2011).

Los cuerpos celulares de la mayoría de las neuronas se organizan en ganglios ubicados en la cabeza y en la cola del nematodo. Los procesos de las neuronas se extienden desde los ganglios, y viajan formando manojos de nervios hacia zonas del neuropilo donde se llevarán a cabo sinapsis químicas y eléctricas. Casi todas las neuronas tienen morfologías monopolares o bipolares simples con procesos no ramificados. Estos procesos neuronales podrían tener funciones sensoriales, sinápticas o mixtas (Altun y Hall, 2011). Los procesos que salen del cuerpo de las neuronas, las neuritas, llevan a cabo transmisiones sinápticas con otras en cuatro áreas principales: el anillo nervioso que rodea la faringe, el cordón nervioso ventral, el dorsal y el neuropilo de la cola (Corsi et al., 2015).

En *C. elegans* las neuronas se clasifican en cuatro categorías funcionales: motoneuronas que realizan contactos sinápticos sobre células musculares, neuronas sensoriales que presentan especializaciones para percibir las señales del ambiente, interneuronas que procesan información y las neuronas polimodales que tienen más de una función, como por ejemplo las neuronas M3 de la faringe que son motoras y sensoriales (Altun y Hall, 2011).

De todas las neuronas presentes en *C. elegans*, 113 son motoneuronas que controlan los comportamientos de locomoción. De esas neuronas, 75 inervan músculos del cuello y del cuerpo, y pertenecen a 8 clases diferentes (AS, DA, DB, DD, VA, VB, VC y VD). Las motoneuronas tipo A- y B- (AS, DA, VA, VB, DB) son colinérgicas y estimuladoras, mientras que las tipo D- (VD, DD) secretan ácido γ aminobutírico, son GABAérgicas e inhibitorias y postsinápticas de otras motoneuronas. Las motoneuronas VC expresan diversos neurotransmisores y su blanco principal son los músculos de la vulva. Las clases VA, VB, VC y VD inervan músculos ventrales mientras que las DA, DB, DD, y AS músculos dorsales (Altun y Hall, 2011).

Además de neuronas, *C. elegans* cuenta con células de soporte como la glia, asociadas con neuronas sensoriales (Corsi et al., 2015).

Músculos: Los músculos de la pared del cuerpo se disponen en cuatro cuadrantes, dos dorsales y dos ventrales, que se extienden a lo largo de todo el organismo (Figura 3). Estos músculos somáticos son oblicuamente estriados, mononucleados, ya que las células musculares no se fusionan como sucede en vertebrados, y presentan múltiples sarcómeros por célula (Corsi et al., 2015).

Cada célula muscular somática está formada por tres partes: la fibra o huso que contiene actina y miosina y es contráctil, el vientre o bolsa muscular donde se encuentra el núcleo, mitocondrias y es rico en glucógeno siendo un depósito de energía, y el brazo muscular que es la conexión desde la célula muscular hasta el cordón nervioso (Martin, 1996; Trailović et al., 2015).

La innervación es particular, las células musculares envían extensiones llamadas brazos musculares hacia procesos de neuronas motoras que corren a lo largo de los cordones nerviosos o que residen en el anillo nervioso (Corsi et al., 2015). Los 16 músculos de la cabeza poseen brazos musculares que hacen sinapsis exclusivamente con motoneuronas del anillo nervioso, los 16 músculos del cuello extienden brazos musculares al anillo nervioso y al cordón nervioso más cercano y los 63 músculos del cuerpo extienden brazos musculares exclusivamente al cordón nervioso más cercano. Los músculos de faringe no extienden brazos musculares, las neuronas

M2 atraviesan el músculo y realizan uniones neuromusculares dentro de las células musculares (Altun y Hall, 2009b).

Además de los músculos somáticos, *C. elegans* posee músculos no estriados que controlan la alimentación (músculos faríngeos), la puesta de huevos (músculos de la vulva y uterinos), la cópula (músculos de la cola específicos de machos) y la defecación (músculos entéricos) (Corsi et al., 2015).

Sistema digestivo: El alimento, la bacteria, ingresa al nematodo por la parte anterior del mismo donde se encuentra la boca y la cavidad bucal. Luego pasa a través de la faringe, una bomba neuromuscular compuesta por dos lóbulos que procesa el alimento (Corsi et al., 2015). La faringe es un órgano que posee su propio sistema nervioso, músculos y epitelio (Altun y Hall, 2009a). Este órgano debe bombear rítmicamente mediante un ciclo de contracciones y relajaciones para que el nematodo pueda alimentarse (Dent et al., 1997). La sincronización de la relajación está modulada por un par de neuronas motoras glutamatérgicas faríngeas simétricas bilaterales denominadas M3 (Dent et al., 1997).

Luego el alimento pasa hacia el intestino, que está unido a la parte posterior de la faringe, para continuar la digestión. El contenido intestinal es excretado al exterior mediante la válvula rectal que conecta el intestino con el recto y ano (Figura 2) (Altun y Hall, 2009a).

Sistema reproductivo: Existen diferencias anatómicas entre nematodos machos y hermafroditas (Corsi et al., 2015). Los nematodos hermafroditas poseen una gónada compuesta por dos brazos en forma de U simétricos bilateralmente que se conectan al útero central a través de la espermateca (Figura 2). La gónada de los machos tiene un solo lóbulo en forma de U que abre al exterior mediante la cloaca (ano) (Altun y Hall, 2009a).

Las estructuras sexuales secundarias utilizadas durante la cópula son, la vulva en los hermafroditas y el aparato copulador de machos localizado en la cola. Los machos adultos son más delgados en comparación con los hermafroditas debido a que la gónada es más chica y a la ausencia de embriones en su interior (Corsi et al., 2015).

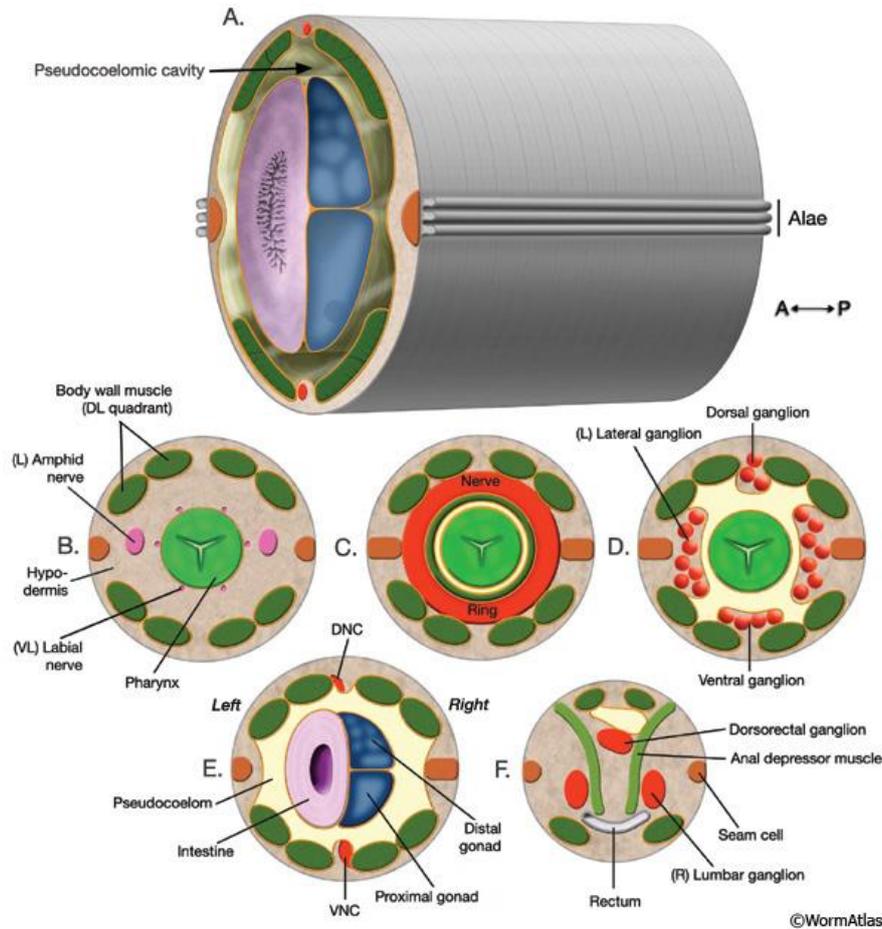


Figura 3: Plan corporal del nematodo en secciones transversales desde la cabeza a la cola. El nivel aproximado de cada sección está marcado con líneas punteadas en la Figura 2B. A. Región corporal posterior. El tubo externo está separado del interno por un pseudoceloma. Secciones a través de la cabeza anterior (B), media (C), posterior (D). E. Sección a través de la parte posterior del cuerpo. Cordón nervioso dorsal (*Dorsal Nerve Cord*, DNC) y cordón nervioso ventral (*Ventral Nerve Cord*, VNC). F. Sección a través de la cola, área del recto (Imagen tomada de *WormAtlas*).

Locomoción de *C. elegans*

La locomoción es uno de los comportamientos esenciales estudiados en esta Tesis ya que permite evaluar y comprender los efectos rápidos de diferentes compuestos sobre el nematodo modelo. Además, aporta información relevante ya que *C. elegans* responde de manera similar a especies parasíticas.

En superficies sólidas, durante el comportamiento de exploración, *C. elegans* se mueve hacia adelante en forma de “S”, y dicha locomoción es interrumpida por ocasionales giros y reversiones breves. Cuando recibe un estímulo en la parte anterior del cuerpo, el animal se mueve hacia atrás, y cuando recibe un estímulo en la parte posterior se mueve hacia adelante. En medio líquido presenta un comportamiento de nado en forma de “C” y la frecuencia de

ondulaciones es más rápida en comparación a cuando se desplaza en superficies sólidas (Altun y Hall, 2011).

Los músculos de la pared del cuerpo del nematodo son los que llevan a cabo la locomoción. Exceptuando los músculos de la cabeza, los músculos dorsales solo forman sinapsis con el cordón nervioso dorsal y los ventrales con el cordón nervioso ventral. La contracción y relajación alternadas de los músculos longitudinales ventrales y dorsales del cuerpo permiten los movimientos sinusoidales típicos del nematodo (Corsi et al., 2015). Las ondulaciones se producen en el plano dorso-ventral creando curvas sinusoidales cuando el animal se posiciona sobre su lado lateral en el sustrato. La propagación de las contracciones y relajaciones secuenciales desde la parte anterior hacia la posterior permiten la locomoción hacia adelante (Altun y Hall, 2011).

Tanto las neuronas motoras GABAérgicas DD y VD, como las neuronas motoras colinérgicas DB y VB, envían *inputs* hacia los músculos de la pared del cuerpo dorsales y ventrales respectivamente. La liberación del neurotransmisor ACh por parte de las neuronas colinérgicas permite la contracción de los músculos de la pared del cuerpo en un lado y estimula la liberación de otro neurotransmisor inhibitorio GABA por las neuronas GABAérgicas en los músculos del lado opuesto, promoviendo la relajación muscular. La estimulación e inhibición contralateral hacen que el cuerpo del nematodo se doble y permiten la locomoción coordinada (Figura 4) (Schuske et al., 2004).

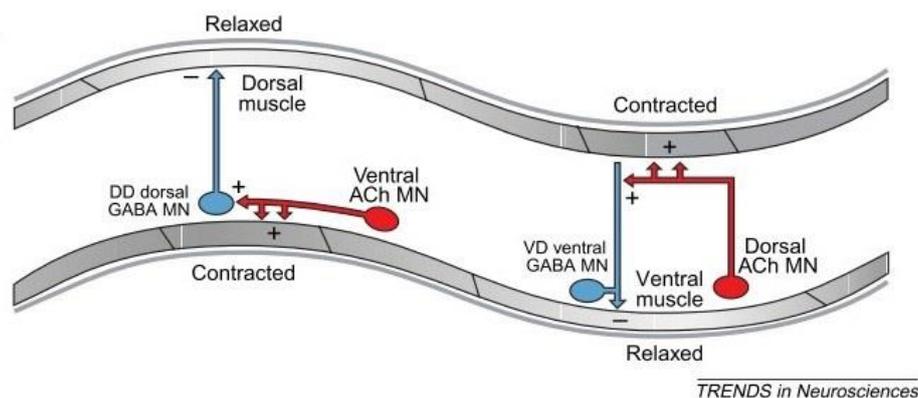


Figura 4: Conectividad de motoneuronas. Los cuerpos de las neuronas se ubican en el cordón nervioso ventral. Las neuronas GABAérgicas (azules) DD y VD realizan transmisión sináptica con los músculos dorsales y ventrales respectivamente y las motoneuronas colinérgicas (rojas) también envían *inputs* a músculos ventrales y dorsales. La liberación de ACh genera la contracción de los músculos de la pared del cuerpo en un lado y estimula la liberación de GABA en los músculos del lado opuesto. Esta estimulación e inhibición contralateral genera los movimientos corporales y la locomoción coordinada (Schuske et al., 2004).

Las interneuronas también intervienen estableciendo la dirección de la locomoción. El movimiento hacia adelante es promovido por *inputs* de interneuronas AVB y PVC sobre neuronas DB y VB, mientras que el movimiento hacia atrás es promovido por *inputs* de interneuronas AVA, AVD y AVE sobre neuronas DA y VA (Altun y Hall, 2011).

Sinapsis

La sinapsis química es una de las principales formas de comunicación neuronal. Puede llevarse a cabo entre dos neuronas o entre una neurona y un músculo, en ambos casos separados por un espacio sináptico. La célula que emite el mensaje se denomina “pre-sináptica” y la receptora “post-sináptica”. La sustancia liberada por la célula presináptica al espacio sináptico que genera respuesta en el efector en ausencia completa del emisor se denomina neurotransmisor.

Ante la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico, se genera despolarización y se activan canales de calcio presentes en la membrana terminal. El calcio ingresa a la célula aumentando su concentración intracelular, lo cual inicia la exocitosis de las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores. Las vesículas vierten su contenido en el espacio sináptico, los neurotransmisores difunden y se unen a receptores presentes en la célula postsináptica. Los receptores postsinápticos pueden ser ionotrópicos o metabotrópicos. En los receptores ionotrópicos la unión del neurotransmisor desencadena la apertura del canal que permite el pasaje de iones a través de la membrana, generando así un efecto rápido y directo. En los receptores metabotrópicos, los neurotransmisores se unen y activan el receptor desencadenando una cascada de señalización celular, generando así efectos más lentos y prolongados (Hill et al., 2006).

Las sinapsis químicas especializadas denominadas uniones neuromusculares (*NeuroMuscular Junctions*, NMJs) se llevan a cabo entre una célula presináptica y una célula muscular postsináptica (Altun y Hall, 2011). En vertebrados, la unión neuromuscular se forma entre el terminal sináptico de la neurona motora, que libera acetilcolina (ACh), y el músculo, que posee alta densidad de nAChRs en la placa neuromuscular. En *C. elegans*, la NMJ está involucrada en su locomoción (Altun y Hall, 2011).

A diferencia de otros organismos en los cuales la neurona envía procesos hacia las células musculares para la comunicación celular, las NMJ de *C. elegans* se llevan a cabo mediante la extensión de brazos musculares hacia las neuronas motoras (Dixon y Roy, 2005). Dichas sinapsis se generan *en passant* entre procesos vecinos (Altun y Hall, 2011). Luego de la neurotransmisión excitatoria colinérgica en la NMJ, se cree que la apertura de los nAChR

presentes en la membrana muscular inicia potenciales de acción graduados en los brazos musculares que luego convergen y se propagan en el compartimiento contráctil del músculo. Como no hay evidencia de la presencia de canales de sodio activados por voltaje en *C. elegans*, se cree que los potenciales de acción son dependientes de corrientes de calcio activadas por voltaje en la membrana plasmática de los músculos. La activación de estos canales de calcio genera un flujo de calcio hacia el interior celular que inicia la contracción en los músculos de la pared del cuerpo del nematodo (Altun y Hall, 2009b).

Además de las sinapsis químicas, las neuronas se comunican con otras células mediante sinapsis eléctricas o uniones gap (*Gap Junctions*, GJs) que se forman por contacto estrecho entre células, sus membranas plasmáticas se mantienen unidas por proteínas. En nematodos, las GJs están formadas por proteínas intermembrana llamadas inexas (Altun y Hall, 2011).

Receptores *Cys-loop*

Los receptores *Cys-loop* forman parte de la superfamilia de canales iónicos activados por ligandos (LGICs). Están compuestos por cinco subunidades rodeando un poro central permeables a diversos iones. Los canales catiónicos median la transmisión química excitatoria, mientras que los canales permeables a iones cloruro generalmente están asociados a respuestas sinápticas inhibitorias rápidas (Brown et al., 2006). El motivo característico “*Cys-loop*” consiste en un enlace disulfuro formados por dos cisteínas separadas por 13 residuos aminoacídicos y se sitúa en la región extracelular de cada subunidad (Figura 5). El *loop* formado por cisteínas tiene roles en el ensamblaje (Green y Wanamaker, 1997) y en la activación del canal iónico (Grutter et al., 2005; Bouzat et al., 2008). Los receptores *Cys-loop* que median la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso, incluyen a los receptores activados por ACh, GABA, glicina y serotonina (Bouzat, 2012; Bouzat y Mukhtasimova, 2018). Estos receptores están involucrados en procesos fisiológicos como la contracción muscular, el aprendizaje y la memoria, y su alteración desencadena desórdenes neurológicos (Bouzat, 2012). *C. elegans* posee una familia de receptores *Cys-loop* más extensa que la de los vertebrados y con un repertorio mucho más variado (Jones y Sattelle, 2008). La neurotransmisión rápida en *C. elegans*, está mediada por receptores *Cys-loop* activados por los neurotransmisores ACh, GABA, glutamato y monoaminas (Altun y Hall, 2011).

Receptores nicotínicos: prototipo de LGICs

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) son el prototipo de canales iónicos activados por ligandos (Figura 5) (Brown et al., 2006). Son receptores *Cys-loop* ampliamente

distribuidos en el reino animal, desde nematodos hasta el hombre (Jones et al., 2007; Bouzat, 2012). Pueden ser activados por el agonista endógeno ACh y por otros agonistas exógenos como la nicotina, motivo por lo cual se le asigna su nombre. Estos receptores traducen la unión de ACh liberada por el terminal sináptico en una señal eléctrica, que inicia el proceso de contracción muscular, transformando así una señal química en una señal eléctrica. La activación de los nAChRs permite principalmente el paso de cationes como sodio y calcio, causando despolarización de la membrana y generando una respuesta rápida. Además, son blancos moleculares de varias drogas, como los relajantes musculares usados en clínica (Bouzat y Mukhtasimova, 2018).

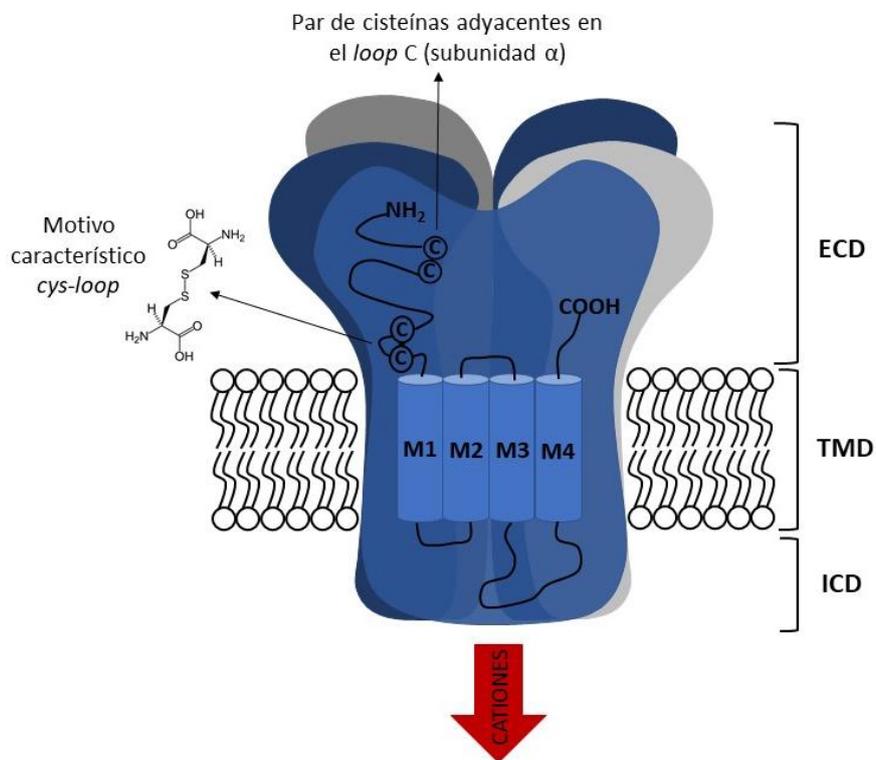


Figura 5: Esquema de la estructura del receptor nicotínico de ACh. Cada receptor consiste en cinco subunidades organizadas alrededor de un canal iónico central. En una de las subunidades se observa el motivo característico *Cys-loop*, el doblete de cisteínas característico de las subunidades α y las cuatro regiones transmembrana (Brown et al., 2006).

Si las cinco cadenas polipeptídicas que conforman el nAChR son idénticas, el receptor se denomina homomérico, mientras que aquellos receptores compuestos por subunidades diferentes son heteroméricos. La combinación de subunidades determina las propiedades funcionales del subtipo de receptor nicotínico. Cada subtipo puede diferir en la permeabilidad iónica, en la afinidad por ACh y en la conductancia del canal (Brown et al., 2006).

En mamíferos, los nAChRs están presentes en la unión neuromuscular conformada por músculos somáticos (receptores neuromusculares), en sistema nervioso central (SNC) y ganglios autonómicos (receptores neuronales) (Trailović et al., 2015). El nAChR heteromérico presente en músculo existe en dos isoformas reguladas por el desarrollo. El músculo embrionario expresa nAChRs compuestos por dos subunidades $\alpha 1$, una β , una γ y una δ ($\alpha_2\beta\gamma\delta$). Durante la maduración del organismo, la subunidad γ es reemplazada por la subunidad ε formando el nAChR adulto ($\alpha_2\beta\varepsilon\delta$). Mediante dicho cambio, se modifican las propiedades farmacológicas, metabólicas y electrofisiológicas del nAChR (Bouzat y Mukhtasimova, 2018). El receptor neuronal homomérico $\alpha 7$ es uno de los nAChRs más abundantes en el SNC y se expresa en regiones implicadas en funciones cognitivas y de memoria como es el hipocampo, corteza y algunas regiones subcorticales límbicas. También expresa en células del sistema inmune donde tiene roles en inmunidad, inflamación y neuroprotección (Corradi y Bouzat, 2016).

Los modelos estructurales muestran que las subunidades presentan una estructura básica formada por un gran dominio extracelular N-terminal formado principalmente por hojas β , tres segmentos transmembrana con estructura de hélices α separados por *loops* cortos, un *loop* citoplasmático de tamaño y secuencia de aminoácidos variable, y un cuarto segmento transmembrana con una secuencia COOH- extracelular terminal relativamente corta y variable (Figura 5) (Bartos et al., 2009).

Los receptores, formados por el ensamble de cinco subunidades, muestran tres dominios con estructuras y funciones diferentes (Figura 5). El dominio extracelular N-terminal (*ExtraCellular Domain*, ECD) contiene los sitios de *binding* (sitios de unión al agonista) llamados sitios ortostéricos. El dominio transmembrana (*TransMembrane Domain*, TMD) está integrado por cuatro hélices α de cada subunidad (M1-M4) y contiene el poro iónico. La región transmembrana M2 de cada subunidad forma las paredes del poro del canal iónico. Contiene en sus extremos anillos formados por aminoácidos cargados negativamente, glutamato y aspartato, que contribuyen con la conductancia del canal y la selectividad a cationes (Robertson y Martin, 2007). Cuando el canal está cerrado, el poro se encuentra contraído debido a las interacciones que existen entre residuos hidrofóbicos de hélices vecinas. Esto genera una barrera energética que los iones deben atravesar, y probablemente corresponda a la compuerta del canal. Además, el poro contiene un filtro de selectividad, una estructura que determina el tipo de ion que es capaz de pasar a través del canal (Bouzat, 2012). El dominio intracelular (*IntraCelular Domain*, ICD), que se une al citoesqueleto, contribuye a la cinética del canal y además contiene determinantes de la conductancia y sitios para la regulación y señalización intracelular (Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat y Mukhtasimova, 2018).

Como se observa en la Figura 6, el sitio de unión al agonista está formado por una interfase entre subunidades (Brejc et al., 2001). Una subunidad contribuye con la cara principal y la adyacente con la cara complementaria. En los nAChRs, las subunidades que tienen un par de cisteínas adyacentes en el *loop* C se denominan subunidades α , mientras que las que carecen de dichas cisteínas son no α (Brown et al., 2006). Solo subunidades tipo α forman la cara principal del sitio de unión, mientras que la cara complementaria puede estar formada ya sea por subunidades α o no α . Cada sitio de unión contiene 6 *loops*, donde los *loops* A-C son aportados por la subunidad que forma la cara principal y los *loops* D-F, por la subunidad que forma la cara complementaria del sitio de unión de agonistas (Brown et al., 2006). Así, los residuos claves de la cara principal se agrupan en *loop* A (Trp 86 y Tyr 93), *loop* B (Trp 149 y Gly 153) y *loop* C (Tyr 190, Cys 192, Cys 193 y Tyr 198) (residuos correspondientes a una subunidad α de *Torpedo*). En la cara complementaria, los residuos claves se ubican en los *loops* D (Trp 55 y Asp57), E (Leu109, Tyr111, Tyr117 y Leu 119), y F (Asp174 y Glu176) (residuos de subunidades δ y γ de *Torpedo*) (Brejc et al., 2001; Bartos et al., 2009; Bouzat, 2012).

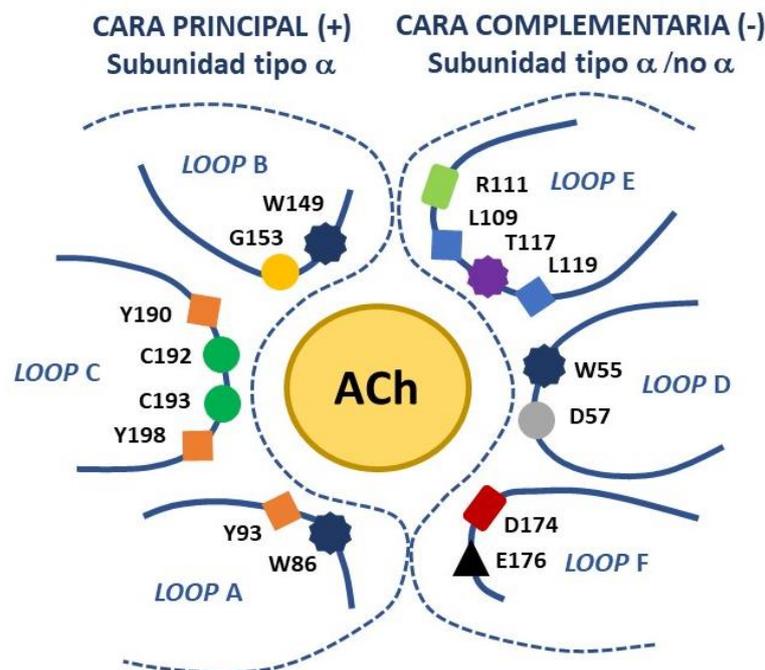


Figura 6: Sitio de unión al agonista entre dos subunidades adyacentes. La cara principal o “positiva” aporta tres *loops* A, B y C, y la otra subunidad que forma la cara complementaria o “negativa” aporta los *loops* D, E y F. Los *loops* contienen diversos residuos aromáticos. En la imagen se muestran los residuos presentes en las subunidades α , δ y γ de *Torpedo* (Changeux y Edelstein, 2001; Bouzat, 2012).

1. Modulación del receptor por ligandos alostéricos

El sitio de unión ortostérico donde se une el agonista, también es el sitio de unión para antagonistas competitivos (Lansdell et al., 2015). Además, se ha identificado una gran variedad de compuestos que modulan las respuestas evocadas por agonistas, mediante unión a distintos sitios alostéricos (Lansdell et al., 2015). Los moduladores alostéricos son moléculas que se unen a sitios diferentes del ortostérico, alterando la barrera energética para las transiciones entre estados conformacionales del receptor y en consecuencia pueden potenciar o inhibir la función del mismo.

Los moduladores pueden clasificarse en diversos grupos:

i) Agonistas alostéricos: son compuestos capaces de activar el receptor a través de la unión a un sitio diferente al ortostérico. Un agonista alostérico de amplio uso como fármaco antihelmíntico es la ivermectina (IVM). Este antihelmíntico activa el GluCl, un receptor *Cys-loop* activado por glutamato y permeable a cloruro. La activación por IVM ocurre, en ausencia del agonista endógeno glutamato, mediante la interacción con un sitio de unión transmembrana (Lansdell et al., 2015).

ii) Moduladores alostéricos negativos (*Negative Allosteric Modulators, NAMs*): inhiben la función del receptor mediante diferentes mecanismos moleculares y sitios. Pueden inhibir la función del receptor estabilizándolo en un estado no conductor o incrementando la velocidad y extendiendo la desensibilización.

Los bloqueadores de canal abierto también modulan la funcionalidad del receptor inhibiendo el flujo de iones, y son considerados antagonistas no competitivos.

iii) Moduladores alostéricos positivos (*Positive Allosteric Modulators PAMs*): potencian la respuesta generada por el agonista. En el caso del nAChR, los PAMs no lo activan ni compiten con ACh por la unión, pero potencian las respuestas evocadas por los agonistas. En particular, los PAMs de $\alpha 7$ emergen como nuevos fármacos para desordenes neurológicos y neurodegenerativos (Bouzat y Sine, 2018)

iv) Moduladores alostéricos silenciosos (*Silent Allosteric Modulators SAMs*): no tienen efecto en la respuesta del agonista ortostérico, pero bloquean la modulación alostérica (Bouzat y Sine, 2018).

El dominio lipídico anular ubicado alrededor del receptor y el no anular, entre hélices transmembrana y subunidades, son sitios donde pueden unirse una gran variedad de antagonistas no competitivos hidrofóbicos e inhibir la función del receptor mediante diferentes mecanismos (Bouzat y Mukhtasimova, 2018).

2. Activación de los nAChRs

La unión de agonistas en el dominio extracelular es traducida en la apertura del canal (Bouzat y Mukhtasimova, 2018). Varias fuerzas estabilizan al agonista en el sitio de unión, sin embargo, en los receptores *Cys-loop* las interacciones cation- π entre el amonio cuaternario del agonista y residuos aromáticos, conservados en todos los nAChRs y presente en la cara principal y complementaria, son determinantes de la afinidad de unión del agonista y de la activación del canal. Esta cavidad aromática está dada por los residuos Y93 (*loop A*), W149 del (*loop B*), Y190 e Y198 (*loop C*) de la cara principal y W55 (*loop D*) de la cara complementaria (Bouzat, 2012).

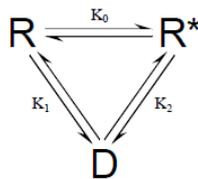
Los agonistas afectan la movilidad de los *loops C* y *F* del sitio de unión. En el estado de reposo del receptor el *loop C* adopta una conformación abierta que permite el ingreso del ligando. Al unirse el agonista en el sitio de *binding*, el *loop C* cambia su conformación y rota hacia la cavidad cerrándose sobre la molécula agonista unida, alcanzando así un estado cerrado (Gao et al., 2005; Law et al., 2005; Taly et al., 2005; Wang et al., 2009). Dicho movimiento sería el cambio que inicia la activación del canal en respuesta a la unión del agonista. Los agonistas parciales producen cierres incompletos generando conformaciones del *loop C* semicerrado. Luego del cierre del *loop C*, se llevan a cabo una serie de cambios conformacionales que se propagan hacia la compuerta del canal a través de la interfase dominio extracelular-transmembrana, denominada región de acoplamiento. Esta región es clave para acoplar los cambios del dominio extracelular con los movimientos de las hélices transmembranales que abren la compuerta del canal. También está involucrada en el tiempo de estado abierto del canal y en la velocidad de desensibilización (Bouzat et al., 2008).

El punto final del proceso de activación es la eliminación transitoria de la barrera energética que impide el flujo de iones. Los cambios en el ECD son transmitidos a través de la región de acoplamiento para generar una rotación-inclinación concertada de las hélices α del TMD que abre la compuerta por desestabilización de las interacciones en los anillos hidrofóbicos de M2. Así, el receptor alcanza la conformación de estado abierto que permite el pasaje de los iones. El canal se abre por la inclinación global de las hélices M2 junto con el segmento M3 y el *loop M2-M3* de la región de acoplamiento, mientras que los segmentos M1 y M4 se muestran comparativamente más fijo y menos flexibles (Hilf y Dutzler, 2008; Nemezc et al., 2016).

La respuesta funcional de los LGIC puede ser interpretada mediante una serie de cambios conformacionales generados por la unión de un agonista: cerrado (R), abierto (R*) y desensibilizado (D). La unión de moléculas agonistas al receptor genera un estado abierto en el cual el canal permite el flujo de iones. En presencia continua de agonista, el receptor se vuelve

refractario al estímulo y la respuesta celular declina. Este estado, denominado desensibilizado, presenta alta afinidad por el agonista y es impermeable a iones. El estado cerrado, es un estado en reposo y con baja afinidad por el agonista (Zhang et al., 2013). Existen estados intermedios entre cerrado y abierto o entre abierto y desensibilizado, y el número de estados y la velocidad de transición entre ellos determinan la cinética del receptor (Corradi y Bouzat, 2016).

Un modelo simple que representa estos estados conformacionales puede ser el siguiente:



En ausencia de agonista el receptor se encuentra en estado de reposo (R). Cuando se une un agonista se estabiliza en estado abierto (R*). Una exposición prolongada al agonista estabiliza el estado desensibilizado (D). K_0 , K_1 y K_2 representan las constantes de equilibrio para cada transición (Jackson, 1992; Bertrand y Gopalakrishnan, 2007).

Receptores *Cys-loop* en *C. elegans*

C. elegans posee la familia de genes para subunidades de nAChRs y la superfamilia de canales iónicos *Cys-loop* activados por ligandos más extensas. Cuenta con 29 subunidades de nAChRs que se organizan en cinco grupos según la homología de secuencias y con 102 genes que codifican subunidades de LGICs *Cys-loop* (Jones et al., 2007; Jones y Sattelle, 2008).

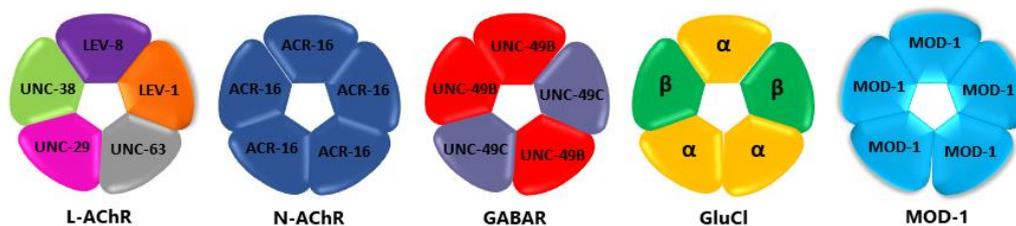


Figura 7: Posibles estequiometrías de los receptores *Cys-loop* presentes en *C. elegans*. Receptor nicotínico de ACh sensible a levamisol (L-AChR), receptor nicotínico de ACh sensible a nicotina (N-AChR), receptor de GABA (GABAR), receptor de glutamato (GluCl) y receptor de serotonina (MOD-1).

A diferencia del ser humano que posee nAChRs y receptores de serotonina o 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃) catiónicos, y receptores de GABA y de glicina aniónicos, *C. elegans*, cuenta con receptores de glutamato y serotonina permeables exclusivamente a

aniones y con receptores activados por ACh y GABA que son permeables a cationes y otros a aniones (Jones y Sattelle, 2008).

	Catiónicos	Aniónicos
<i>C. elegans</i>	Receptores de ACh y GABA.	Receptores de ACh, GABA, glutamato y serotonina.
Hombre	Receptores de ACh y serotonina (5-HT ₃).	Receptores de GABA y de glicina.

Tabla 2: Diferencias entre receptores *Cys-loop* del hombre y de *C. elegans*. El hombre posee nAChRs catiónicos y GABAR aniónicos mientras que *C. elegans* cuenta con una mayor variabilidad de receptores.

1. Receptores nicotínicos

Existen dos subtipos de nAChRs en la unión neuromuscular de *C. elegans*, el receptor de ACh sensible a levamisol (L-AChR) y el sensible a nicotina (N-AChR) (Figura 7) (Richmond y Jorgensen, 1999). Estos receptores presentan diferentes propiedades cinéticas, composición de subunidades y farmacología. Si bien ambos receptores de ACh contribuirían en la locomoción de *C. elegans*, el L-AChR presenta un rol más importante y funcional en dicha actividad (Touroutine et al., 2005).

Cinco genes codifican para subunidades que conforman el L-AChR presente en nematodos adultos: *unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* y *lev-8* (Fleming et al., 1997; Culetto et al., 2004; Towers et al., 2005; Almedom et al., 2009). Las subunidades UNC-38, UNC-63 y LEV-8 que integran este receptor son de tipo α , y LEV-1 y UNC-29 son subunidades no α (Rayes et al., 2007). Tres de estas subunidades, UNC-29, UNC-38 y UNC-63, son esenciales para formar receptores funcionales, mientras que LEV-1 y LEV-8 son accesorias y pueden ser reemplazadas por otras subunidades (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012). La droga antiparasitaria levamisol actúa como un agonista parcial del subtipo L-AChR (Hernando et al., 2012; Blanchard et al., 2018). Los nematodos mutantes nulos para las subunidades esenciales exhiben un fenotipo descoordinado (por ello a ese tipo de subunidades se las denomina UNC, del inglés “*UNCoordinated*”) y son altamente resistentes a levamisol. En cambio, los nematodos mutantes nulos para las subunidades no esenciales exhiben un fenotipo muy similar al de los individuos salvajes y son parcialmente resistentes a levamisol (LEV, del inglés “*LEVamisole resistant*”).

El otro subtipo de nAChR presente en la musculatura del cuerpo del nematodo es un homopentámero formado por subunidades ACR-16 denominado receptor de ACh sensible a

nicotina (N-AChR) e insensible a levamisol (Francis et al., 2005; Touroutine et al., 2005; Brown et al., 2006). ACR-16 es una subunidad α con un 47 % de homología con la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico de vertebrados (Ballivet et al., 1996). ACR-16 ha sido sugerido como un blanco de drogas en parásitos como *A. suum* y *Parascaris equorum* (Abonqwa et al., 2016; Charvert et al., 2018).

Como es posible realizar estudios electrofisiológicos en las uniones neuromusculares de *C. elegans* (Richmond y Jorgensen, 1999), la actividad de canal único de los L-AChRs pudo ser registrada en células musculares de larvas L1, permitiendo la caracterización de dicho subtipo de receptor. En cambio, la actividad de los N-AChRs no fue detectable mediante esta técnica electrofisiológica (Raya et al., 2007). En registros de *whole-cell*, utilizando células musculares de larvas L1, se registraron corrientes macroscópicas correspondientes al N-AChR activadas por ACh. Sin embargo, a diferencia de las generadas por L-AChRs, las corrientes fueron pequeñas y su detección variable entre diferentes células. Por lo tanto, durante la transmisión neuromuscular en larvas L1 de *C. elegans* la mayor corriente generada por ACh fluye a través de los L-AChRs (Raya et al., 2007; Hernando et al., 2012). Es posible inferir que el nivel de expresión del N-AChR en el estadio L1 sería muy bajo a diferencia de lo que ocurre en el nematodo adulto donde las corrientes del N-AChR son importantes. Por lo tanto, la contribución del N-AChR a la corriente total activada por ACh es insignificante en células de larvas L1, pero más importante en el estadio adulto (Touroutine et al., 2005; Almedom et al., 2009).

En nematodos parásitos, además de los L-AChRs y N-AChRs, se identificó un tercer subtipo, el subtipo B, sensible a befenio (Robertson et al., 2002; Martin et al., 2004; Qian et al., 2006). En el parásito *H. contortus*, befenio activa selectivamente el receptor Hco-L-AChR1 formado por las subunidades Hco-UNC-29.1, -38, -63a y ACR-8. El receptor Hco-L-AChR2, conformado por las mismas subunidades, pero sin ACR-8, no es activado por la droga. Por lo tanto, la subunidad Hco-ACR-8, que está asociada a la sensibilidad a levamisol (Boulin et al., 2008), estaría involucrada en la sensibilidad a befenio (Charvet et al., 2012). En *A. suum* befenio actúa como activador potente de los canales activados por levamisol que se diferencian en dos poblaciones según su conductancia 35 y 45 pS (G35 y G45). Esto indica que tanto levamisol como befenio pueden actuar sobre los mismos subtipos de nAChRs, aunque befenio activa preferentemente los canales con una conductancia de 45 pS. Dichos receptores son antagonizados por 2-desoxoparاهرqueamida o por parاهرqueamida (Qian et al., 2006).

Además de los nAChRs musculares, *C. elegans* cuenta con subunidades que integran nAChRs neuronales. Por ejemplo, DEG-3/DES-2 es un nAChR localizado en neuronas PVD y DVC del nematodo (Holden-Dye et al., 2013).

2. Receptor de GABA

Los canales activados por GABA permeables a cloruro son LGIC miembros de la familia de receptores *Cys-loop* y tienen importantes roles inhibitorios tanto en el sistema nervioso de vertebrados como de invertebrados. En vertebrados los receptores de GABA ionotrópicos que están presente en el sistema nervioso son designados tipo A (Priestley et al., 2003). Los receptores GABA_A son los principales receptores de la neurotransmisión inhibitoria en el cerebro de mamíferos (Price y Lummis, 2014). Pueden estar formados por subunidades iguales o diferentes, y la gran variedad de subunidades genera un amplio espectro de subtipos de receptores (Hernando y Bouzat, 2014).

En la unión neuromuscular de *C. elegans* también está presente el receptor de GABA, que media la relajación muscular permitiendo el movimiento sinusoidal típico del nematodo (Figura 7) (Touroutine et al., 2005). Este receptor de GABA tipo A muscular, llamado también receptor UNC-49, es codificado por el gen *unc-49*. El locus *unc-49* codifica tres subunidades diferentes: UNC-49A, UNC-49B y UNC-49C (Bamber et al., 1999; Schuske et al., 2004; Bamber et al., 2005). En nematodos adultos, el receptor de GABA es un heterómero compuesto por subunidades UNC-49B y UNC-49C, mientras que la subunidad UNC-49A es prácticamente indetectable en dicho estadio. UNC-49B permite la localización sináptica y es esencial para la apertura del canal, mientras que UNC-49C es una subunidad moduladora. Mutantes nulos en *unc-49* exhiben un fenotipo contraído debido a la hipercontracción en los músculos de la pared del cuerpo y a la ausencia de relajación (Hernando y Bouzat, 2014).

El gen *unc-49* también está presente en nematodos parásitos como *H. contortus*, *Brugia malayi* y *A. suum*. Los receptores de GABA son blancos de agentes antihelmínticos muy utilizados como la piperazina. Esta droga tiene actividad GABA mimética y causa parálisis flácida de los músculos de la pared del cuerpo de los nematodos (Martin, 1985). La IVM, otra droga antihelmíntica de uso común modula los receptores de GABA (Lynagh y Lynch, 2012).

Los receptores UNC-49 coinciden en algunos aspectos estructurales y farmacológicos con los receptores GABA_A de mamíferos, pero también difieren en otros (Hernando y Bouzat, 2014). Como los receptores GABA_A son blancos farmacológicos de anestésicos y medicamentos utilizados para tratar la epilepsia y ansiedad, promover análisis comparativos con receptores

UNC-49 podría ayudar a elucidar acciones de agonistas y antagonistas en receptores GABA_A (Schuske et al., 2004).

3. Receptor de glutamato

Los canales permeables a cloruro activados por glutamato (GluCl) son LGIC *Cys-loop* presentes únicamente en invertebrados y se relacionan con el receptor de glicina de mamíferos (GlyR) y el receptor de GABA_A (Lynagh et al., 2014). Estos receptores, además de ser los principales blancos moleculares de la droga antihelmíntica IVM, son blancos atractivos de antihelmínticos en desarrollo ya que no hay homólogos en las especies hospedadoras, y están presentes tanto en nematodos como insectos parásitos (Robertson y Martin, 2007).

Los GluCls se localizan en neuronas y células musculares, donde median corrientes de cloruro inhibitorias (Wolstenholme, 2012). El glutamato, actuando como un neurotransmisor inhibitorio, se une a GluCls, genera la apertura de los canales y el cloruro ingresa a la célula. Como estos receptores están presentes en la faringe de los nematodos, el efecto terapéutico de las avermectinas es la parálisis del bombeo faríngeo causando pérdida de la presión de turgencia interna o inanición (Robertson y Martin, 2007).

El agonista endógeno glutamato y la droga IVM actúan en diferentes sitios del GluCl (Figura 8). El glutamato se une al ECD entre los *loops* A, B y C de la cara principal de una subunidad, y los *loops* D, E, F y G de la cara complementaria de la subunidad adyacente, mientras que la IVM ocupa una cavidad entre subunidades adyacentes en el TMD que forma el sitio alostérico (Lynagh et al., 2014).

Existe un gran número de genes en los nematodos que codifican subunidades de GluCls. Estas podrían generar diversos tipos de receptores con diferente sensibilidad al neurotransmisor endógeno y a los antihelmínticos (Robertson y Martin, 2007). En *C. elegans* existen cuatro genes que codifican subunidades GluCl α y dos de ellas son generadas por *splicing* alternativo: *glc-1* codifica GluCl α 1, *avr-15* codifica GluCl α 2A y B, *avr-14* que codifica GluCl α 3A y B, y *glc-3* codifica GluCl α 4. Hay una sola subunidad GluCl β codificada por *glc-2*, y existe otro gen *glc-4* que es divergente de los genes que codifican subunidades α y β (Holden-Dye & Walker, 2007).

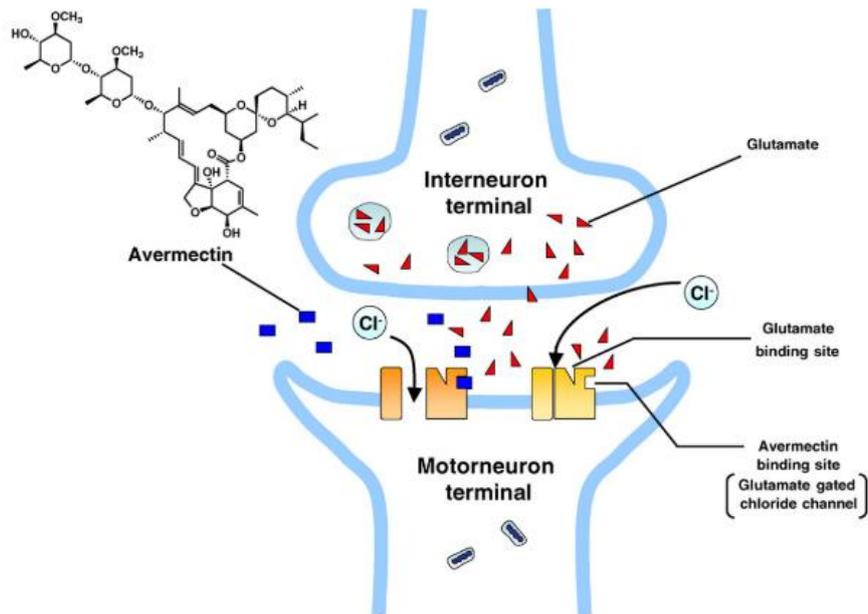


Figura 8: Modo de acción de las avermectinas en la sinapsis de nematodos. El glutamato presente en la interneurona terminal (presináptica) dentro de vesículas sinápticas es liberado al espacio extracelular, difunde y se une al canal de cloruro activado por glutamato (GluCl) presente en la motoneurona terminal (postsináptica). La unión de glutamato al sitio ortostérico del receptor desencadena la apertura del canal permitiendo el paso de aniones a través de la membrana. Las avermectinas se unen a un sitio alostérico del GluCl y lo activan (agonistas alostéricos) o pueden potenciar el efecto del glutamato (Tomado de Ōmura, 2008).

Los genes que codifican las subunidades $\text{GluCl}\alpha_1$ y $\text{GluCl}\beta$, *glc-1* y *glc-2* respectivamente, fueron identificados por primera vez en *C. elegans*. Estas subunidades, al ser co-expresadas en ovocitos, forman un canal heteromérico permeable a cloruro activado por glutamato que además es sensible a la droga IVM (Figura 7) (Cully et al., 1994). Las subunidades $\text{GluCl}\alpha$ y $\text{GluCl}\beta$ también pueden ser expresadas independientemente en ovocitos dando origen a receptores homoméricos. El receptor formado por $\text{GluCl}\alpha$ responde a IVM, pero no a glutamato, y el receptor integrado por subunidades $\text{GluCl}\beta$ responde a glutamato, pero no a IVM (Holden-Dye y Walker, 2007).

4. Receptor de serotonina

La serotonina junto con otras aminas biogénicas como la dopamina, la octopamina y la tiramina actúan modulando el comportamiento en *C. elegans* en respuesta a cambios en señales ambientales. Estos neurotransmisores actúan tanto en neuronas como en músculos y afectan la puesta de huevos, el bombeo faríngeo, la locomoción y el aprendizaje. El mecanismo de

señalización de serotonina le permite a *C. elegans* responder a cambios en el medio ambiente modulando la locomoción (Chase y Koelle, 2007).

La serotonina es sintetizada en neuronas motoras neurosecretoras (Chase y Koelle, 2007). Se identificaron cuatro receptores de serotonina, tres de ellos son receptores metabotrópicos asociados a proteínas G (SER-1, SER-4 y SER-7), y uno es un canal permeable a cloruro activado por serotonina (MOD-1) (Figura 7) (Olde y McCombie, 1997; Hamdan et al., 1999; Ranganathan et al., 2000; Hobson et al., 2003;). El canal ionotrópico (MOD-1) está involucrado en el aumento de la desaceleración del gusano en presencia de bacteria (Ranganathan et al., 2000; Sawin et al., 2000).

Antihelmínticos

Los antihelmínticos son drogas que se utilizan para tratar helmintiasis, es decir infecciones ocasionadas por gusanos parásitos, y son de gran importancia tanto en la medicina humana como en la veterinaria (Figura 9) (Holden-Dye y Walker, 2007).

Dentro de las drogas de uso común se encuentran aquellas que son agonistas colinérgicas como imidazotiazoles (levamisol), tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel y oxantel), aminas cuaternarias/terciarias (befenio y tribendimidina), pirimidinas (metiridina) y derivados de amino-acetonitrilo (monepantel) (Trailović et al., 2015). Estos antihelmínticos actúan sobre nAChRs presentes en el sistema nervioso y muscular de nematodos. Mimetizan a la ACh, pero a diferencia de lo que sucede con el neurotransmisor nativo, la acetilcolinesterasa no los degrada y la contracción muscular se prolonga debido a que los canales de ACh se mantienen abiertos. Finalmente se produce una parálisis tipo espástica y los nematodos son removidos por movimientos peristálticos del hospedador (Robertson y Martin, 2007; Williamson et al., 2009; Charvet et al., 2012; Bustos et al., 2019). Una ventaja de muchas de estas drogas es que son muy selectivas para los receptores de nematodos y tienen baja eficacia en nAChRs musculares de vertebrados (Hernando et al., 2012).

El análisis farmacológico de levamisol, pirantel y morantel ha aportado evidencias de la existencia de subtipos del nAChR: N-AChR activado preferencialmente por nicotina, B-AChR activado preferencialmente por befenio y el L-AChR activado preferencialmente por levamisol (Holden-Dye y Walker, 2007). Además, el levamisol ha sido utilizado para escaneos genéticos, es decir para identificar y seleccionar individuos con un fenotipo de interés en una población sometida a mutágenos (Brenner, 1974; Lewis et al., 1980), lo cual permitiría comprender el funcionamiento de diversos genes.

Befenio es un antihelmíntico miembro de la clase de drogas amonio cuaternario. Se lo considera agonista colinérgico de un subtipo B-nAChR presente en algunos nematodos parásitos (Charvet et al., 2012). Dercuantel y tribendimidina, también se unen al nAChR subtipo B presente en células musculares de nematodos (Robertson et al., 2015; Bustos et al., 2019).

El receptor de GABA también es blanco de acción de drogas antihelmínticas como por ejemplo la piperazina, un compuesto orgánico formado por un anillo de cuatro carbonos y dos nitrógenos en posiciones opuestas. Comenzó a utilizarse en la década de 1950 y sigue siendo un componente activo de venta libre para tratar infecciones de parásitos en niños (Holden-Dye y Walker, 2007). Es utilizado para tratar obstrucciones intestinales causadas por *Ascaris*. Imita la acción del agonista GABA, hiperpolariza los músculos somáticos del parásito, generando relajación y parálisis tipo flácida (Ruiz-Lancheros et al., 2011; Trailović et al., 2015).

Las avermectinas son un grupo de lactonas macrocíclicas antihelmínticas de amplio espectro, utilizadas para controlar nematodos parásitos tanto en el hombre como en animales. Su efecto terapéutico selectivo se basa en la actividad sobre receptores presentes en nematodos parásitos que están ausentes en los hospedadores (Martin et al., 1996). Son agonistas de canales de cloruro activados por glutamato (GluCl_s). A concentraciones bajas potencian el efecto del glutamato, pero a concentraciones elevadas generan la apertura del canal. También son capaces de actuar sobre receptores de GABA presentes en nematodos (Martin et al., 1996; Trailović et al., 2015).

La IVM, obtenida a partir de avermectinas, es un antiparasitario ampliamente utilizado a nivel mundial (Brown et al., 2006). Actúa mediando la apertura de GluCl_s lo cual incrementa la permeabilidad a iones cloruro en las células. Genera defectos en la neurotransmisión interfiriendo en la sinapsis neuromuscular (Martin et al., 1996; Ōmura, 2008; Ruiz-Lancheros et al., 2011; Robertson et al., 2015; Bustos et al., 2019). Ocasiona parálisis potente y persistente en la musculatura de la pared del cuerpo y también en la faringe de nematodos (Holden-Dye y Walker, 2007).

Dentro del grupo de los ciclooctadepsipéptidos se encuentra la droga antihelmíntica emodepside que actúa sobre canales de potasio dependientes de voltaje o de calcio, y sobre receptores acoplados a proteínas G, generando parálisis tipo flácida (Ruiz-Lancheros et al., 2011; Bustos et al., 2019). En *C. elegans*, emodepside genera inhibición neuromuscular mediante activación de la vía dependiente de SLO-1. SLO-1 es un canal de potasio activado por calcio, homólogo al canal BK de mamíferos, que tiene importantes roles en la regulación de la excitabilidad de células musculares y neuronales (Holden-Dye y Walker, 2007).

Además de los antihelmínticos antes mencionados, que actúan sobre receptores *Cys-loop* y canales, existe una familia de antihelmínticos de amplio espectro que se unen a la proteína tubulina del citoesqueleto y bloquean la formación de microtúbulos, estructuras esenciales para procesos celulares como el transporte intracitoplasmático y la división celular (Robertson et al., 2015; Trailović et al., 2015; Bustos et al., 2019). Esta familia denominada benzimidazoles incluye el albendazol y el mebendazol. Presentan tóxicos fetales y teratogénicos, por ello no se los recomienda en mujeres embarazadas ni en niños menores de un año. Para estos pacientes es más seguro el levamisol o el pamoato de pirantel (Kaplan et al., 2014).

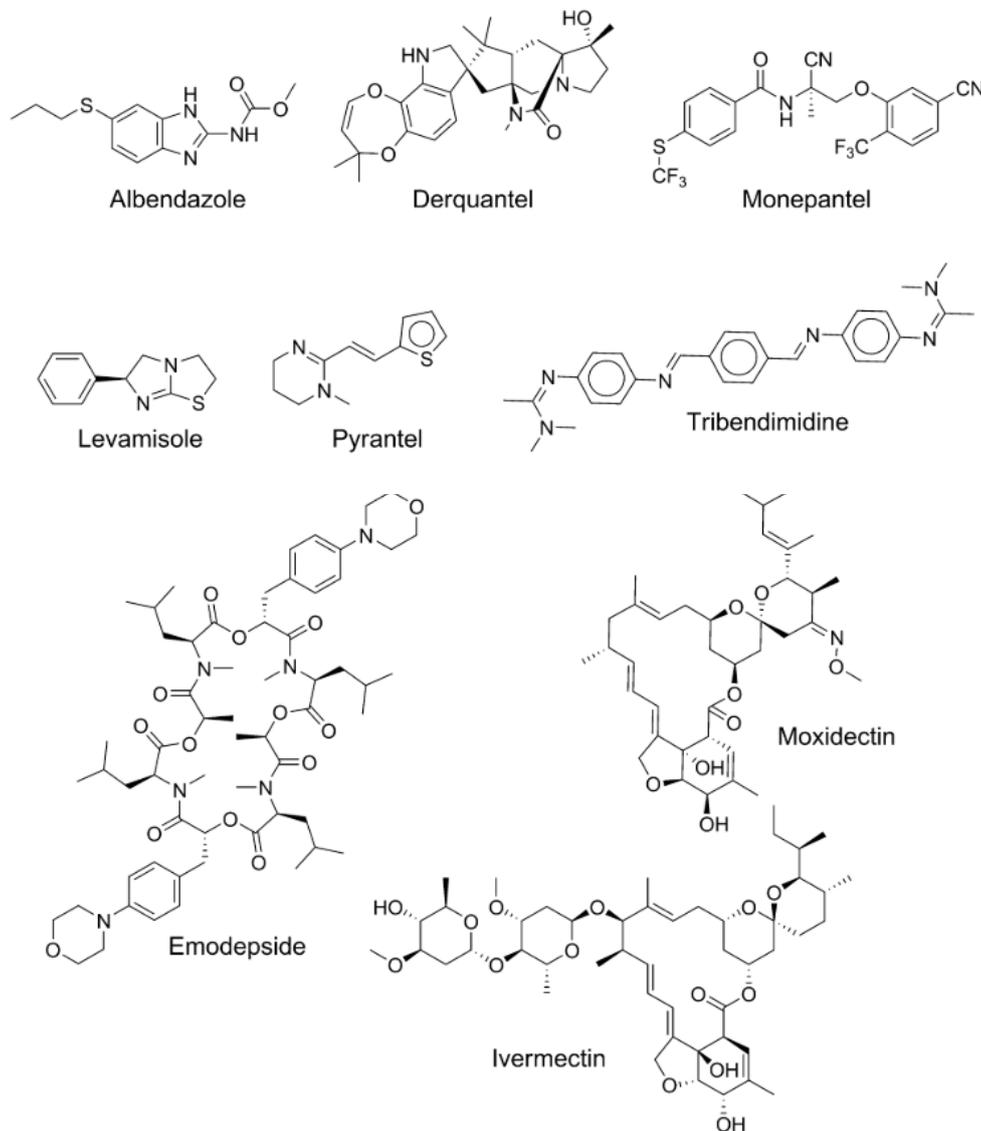


Figura 9: Antihelmínticos utilizados actualmente. El control de los nematodos parásitos depende principalmente de tratamientos con distintos tipos de drogas antihelmínticas (Bustos et al., 2019).

Resistencia a drogas antihelmínticas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que ~ 1,5 billones de personas estuvieron infectadas con parásitos intestinales en 2018, principalmente en comunidades desfavorecidas (Bustos et al., 2019). Si bien existe una mayor prevalencia en los países en desarrollo, se estima que un tercio de la población mundial alberga infecciones helmínticas intestinales (Levandoski et al., 2005). La OMS las considera una de las principales causas de morbilidad, estrechamente ligada a la pobreza y relacionadas a una inadecuada higiene personal, incorrecta manipulación de alimentos crudos, falta de servicios sanitarios, falta de agua potable y contaminación fecal del ambiente (Juárez y Rajal, 2013).

En general, la disponibilidad de drogas para tratar parasitosis es limitada (Qian et al., 2006). Además, el desarrollo de drogas antihelmínticas por parte de la industria farmacéutica es escaso ya que los lugares que sufren estas enfermedades tropicales cuentan con pocos recursos para invertir en el desarrollo de drogas o terapias (Holden-Dye y Walker, 2007). Por otro lado, la disponibilidad de drogas antihelmínticas de amplio espectro, buena tolerancia y bajos costos generó su uso prolongado durante las últimas cinco décadas y en consecuencia la aparición de resistencia en los parásitos (Lanusse et al., 2014). El uso inapropiado de estas drogas contribuye a la selección de cepas resistentes de parásitos lo cual genera una ineficacia de las drogas disponibles (Qian et al., 2006; Roeber et al., 2013; Bustos et al., 2019). Otro inconveniente de estas drogas antiparasitarias es que la resistencia lleva a la necesidad de aplicar mayores dosis, que en consecuencia generan toxicidad. En la medicina veterinaria, principalmente en animales de producción de alimentos, las drogas antiparasitarias requieren largos periodos de descanso luego de su administración (Trailović et al., 2015).

Si bien las bases biológicas y moleculares de la resistencia no se conocen completamente, se sabe que este mecanismo puede ocurrir por diversas causas. Una de ellas es un cambio en el blanco molecular lo cual hace que la droga no pueda reconocer el sitio de unión y como consecuencia sea inefectiva. Por ejemplo la presencia de subunidades truncadas que componen un determinado receptor (Boulin et al., 2011) o el cambio de subunidades que lo integran. Por otro lado, ciertas mutaciones pueden modificar una zona específica del receptor como por ejemplo el sitio de unión al agonista, lo cual hace que cambie la sensibilidad a las drogas ocasionando resistencia. La fosforilación del receptor es otro mecanismo que puede regular la sensibilidad a una determinada droga, generando diferentes respuestas como resultado de las modificaciones postraduccionales del receptor (Trailović et al., 2015).

Otras posibles causas, podrían ser un cambio en el metabolismo que inactiva, elimina la droga o previene su activación o un cambio en la distribución de la droga en el organismo blanco lo cual impide que esta acceda a su sitio de acción (Wolstenholme et al., 2004).

Un mecanismo asociado a la resistencia a drogas, no solo antihelmínticas, sino también a aquellas utilizadas para tratar diferentes tipos de cáncer e infecciones por microorganismos, involucra a la glicoproteína P (P-gp). Estas proteínas transportadoras de drogas son proteínas transmembrana presentes en todos los organismos vivos y ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos. Se encargan de bombear un gran espectro de compuestos fuera de la célula utilizando la energía de la hidrólisis de ATP para transportar las sustancias en contra del gradiente de concentración y generando así una disminución de la concentración intracelular (Lanusse et al., 2018).

Una alternativa posible para generar una reducción o retraso del desarrollo de la resistencia son los agentes polifarmacológicos, es decir aquellos que actúan simultáneamente en varios blancos moleculares y que tendrían mejores perfiles con respecto a la eficacia y a los efectos secundarios, en comparación con ligandos selectivos (Iturriaga-Vásquez et al., 2015). El uso de agentes quimioterapéuticos combinados es una estrategia que ha sido utilizada para tratar muchas enfermedades como cáncer e infecciones bacterianas y virales, y también es una estrategia útil para tratar parasitosis (Lanusse et al., 2018). El fundamento del uso de combinaciones de drogas se basa en que cada parásito individualmente podría tener un bajo grado de resistencia a una fórmula con múltiples componentes, cada compuesto con un modo de acción/resistencia diferente, en comparación al uso de moléculas antihelmínticas simples (Lanusse et al., 2018).

Es de gran importancia estudiar los diversos receptores presentes en los nematodos ya que por un lado permite comprender como se desarrolla la resistencia a antihelmínticos, y por otro lado porque la actividad selectiva de cada uno de ellos, con agonistas específicos, puede ser una herramienta eficaz para evitar dicha resistencia (Qian et al., 2006). Es esencial fomentar la investigación científica que permita el descubrimiento y desarrollo de compuestos nobles y eficaces capaces de combatir las parasitosis que tienen un gran impacto negativo en la salud de muchas personas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *C. elegans* utilizadas

Las cepas fueron adquiridas a través del *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) situado en la Universidad de Minnesota. Dicha institución, junto con la colaboración del Centro Nacional de Recursos de Investigación - Institutos Nacionales de Salud (*National Institutes of Health National - Center for Research Resources*, NIH NCRR), proveen de cepas e información a los investigadores que utilizan al nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*.

Las cepas utilizadas en esta Tesis fueron:

Cepas	Genotipo	Descripción
N2	salvaje	Bristol <i>wild-type</i> .
PD4251	<i>ccls4251 I; dpy-20(e1282) IV</i>	Contiene <i>myo-3::GFP</i> y expresa GFP de manera estable en todos los músculos de la pared del cuerpo y en músculos de la vulva (Timmons et al., 2003).
ZZ15	<i>lev-8(x15) X</i>	Cepa mutante nula que carece de <i>lev-8</i> , con fenotipo salvaje y resistencia parcial a levamisol.
CB904	<i>unc-38(e264) I</i>	Carece de la subunidad UNC-38, esencial para el L-AChR. Fenotipo descoordinado (Blanchard et al., 2018).
CB407	<i>unc-49(e407) III</i>	Subunidad afectada UNC-49B. Esta es suficiente para formar receptores de GABA funcionales en la unión neuromuscular (Bamber et al., 1999).
CB382	<i>unc-49(e382) III</i>	Carece de las subunidades UNC-49 (A, B y C) del receptor de GABA.
DA1316	<i>avr-14(ad1305) I; avr-15(vu227) glc-1(pk54) V</i>	Cepa triple mutante en las subunidades AVR-14, AVR-15 y GLC-1 del GluCl, con alta resistencia a ivermectina.
RB918	<i>acr-16(ok789) V</i>	Carece de la subunidad ACR-16, esencial para el N-AChR.
DA1814	<i>ser-1(ok345) X</i>	<i>ser-1</i> codifica para un receptor de serotonina metabotrópico acoplado a proteína G similar al de mamíferos 5-HT ₂ . El alelo nulo <i>ser-1(ok345)</i> contiene una deleción de 859 pares de bases y una inserción de 25 pares de bases. Dichas modificaciones generan la remoción de al menos dos segmentos transmembrana del receptor (Dempsey et al., 2005).
MT9668	<i>mod-1(ok103) V</i>	Cepa mutante que carece del canal iónico de cloruro activado por serotonina.
AQ866	<i>ser-4(ok512) III</i>	<i>ser-4</i> codifica para un receptor de serotonina metabotrópico acoplado a proteína G similar al de mamíferos 5-HT _{1A} . El alelo nulo <i>ser-4(ok512)</i> contiene una deleción de 1336 pares de bases que remueve el segmento transmembrana 5 y una parte del <i>loop</i>

		intracelular que conecta con el segmento transmembrana 6 (Dempsey et al., 2005).
--	--	--

Tabla 3: Cepas de *C. elegans* utilizadas para el desarrollo de la Tesis. Se detalla el nombre, genotipo y una breve descripción de cada cepa.

Los nombres de las cepas están compuestos por una o dos letras mayúsculas, que indican el laboratorio que las construyó, y un número. Los genotipos se designan con 3 o 4 letras minúsculas, un guion y un número, todo en letra itálica. Las letras de los genes pueden referirse al fenotipo, familia de genes o función, mientras que los números son únicos para cada gen, arbitrarios y generalmente se asocian al orden de descubrimiento. El nombre del alelo se coloca entre paréntesis sin espacios entre el gen y el nombre del alelo. Cuando los genes se encuentran en diferentes cromosomas se expresan separados por punto y coma. El nombre del cromosoma, en letra itálica, también puede estar incluido (Corsi et al., 2015). La proteína producto del gen se refiere a él en mayúscula y no cursiva. Para diferentes productos de un mismo gen se agrega una letra arbitraria en mayúscula.

Cultivo y mantenimiento de *C. elegans*

Los nematodos fueron mantenidos utilizando métodos de cultivo estándar (Brenner, 1974; Stiernagle, 2006; Hernando et al., 2012).

Las cepas fueron mantenidas en placas de Petri de 90 mm conteniendo medio de cultivo para nematodos (*Nematode Growth Medium*, NGM). Para la preparación del NGM se utilizaron: 3 g de NaCl, 17 g de Agar y 2,5 g de Peptona de caseína disueltos en 975 ml de H₂O. Se esterilizó mediante autoclave y posteriormente se enriqueció con 1 ml de MgSO₄ (1 M), 1 ml de CaCl₂ (1 M), 1 ml de colesterol en etanol (5 mg/ml) y 25 ml de *buffer* KPO₄ (1 M) a pH 6. Se utilizó *Escherichia coli* (cepa OP50) como fuente de alimento (Brenner, 1974; Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012). Este microorganismo es auxótrofo para uracilo y su crecimiento es limitado en placas NGM.

Para obtener una mayor cantidad de nematodos, requeridos para ciertos experimentos, se utilizaron placas de Petri de 90 mm con medio de cultivo 8P. Este medio está enriquecido con peptona, se prepara con: 3 g de NaCl, 20 g de Peptona, 25 g de Agar y 1 litro de H₂O, luego se esteriliza por autoclave y se enriquece con 1 ml de colesterol en etanol (5mg/ml), 1 ml de MgCl₂ (1 M), 1 ml de MgSO₄ (1 M) y 25 ml de *buffer* KPO₄ (1 M) a pH 6. Las placas fueron sembradas con bacteria *E. coli* cepa Na22, que crece formando capas muy gruesas y es una fuente de

alimento abundante que permite obtener grandes cantidades de nematodos adultos grávidos (Bianchi y Driscoll, 2006; Sangaletti y Bianchi, 2013).

El cultivo inicial de *E. coli* cepa OP50 se realizó mediante el uso de bacterias obtenidas del CGC. Estas bacterias fueron sembradas mediante la técnica de agotamiento en placas de Petri conteniendo LB agar (10 g de triptona, 5 g de levadura, 5 g de NaCl, 15 g de agar y 1 litro de H₂O, llevado a pH 7,5 y esterilizado por autoclave), un medio enriquecido. Se las dejó crecer durante 24 horas a 37 °C y luego mediante el uso de un ansa se seleccionó una colonia individual. La colonia fue crecida asépticamente en LB (10 g de triptona, 5 g de levadura, 5 g de NaCl y 1 litro de H₂O, llevado a pH 7 usando NaOH 1 M y esterilizado por autoclave) durante 8 horas a 37 °C. Finalmente, la solución de bacterias ya estaba lista para ser sembrada en placas de Petri nuevas con NGM. Luego de sembrarlas, se las dejó secar y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso (Stiernagle, 2006). Para cultivar la cepa de *E. coli* Na22 se realizó el mismo procedimiento, sin embargo, la colonia individual fue crecida en un medio de cultivo denominado 2x YT (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 1 litro de H₂O, pH 7 y esterilizado por autoclave).

Transferencia de nematodos en placas NGM

Las cepas crecidas en placas NGM fueron mantenidas y ampliadas utilizando dos técnicas de transferencia de nematodos. Por un lado, la técnica denominada “*chunking*”, que consistió en cortar con un bisturí una sección (“*chunk*”) de agar conteniendo nematodos y colocarla en una placa nueva con bacterias. Los nematodos se movilizan desde el trozo de agar hacia las bacterias para continuar con su desarrollo. Esta técnica fue utilizada para mantener poblaciones viables. Por otro lado, la segunda estrategia consistió en levantar los nematodos de las placas de Petri utilizando agua destilada y colocarlos en tubos Falcon de 15 ml con una pipeta automática para posteriormente centrifugarlos por 3 minutos a 1200 rpm. Finalmente, los nematodos obtenidos del *pellet* fueron sembrados en placas nuevas con bacterias. Esta técnica fue utilizada para recuperar una mayor cantidad de nematodos, ampliar poblaciones o decontaminar.

Obtención de cultivos sincronizados

La sincronización fue utilizada para obtener nematodos en un mismo estadio de desarrollo. Para ello, nematodos hermafroditas grávidos fueron recolectados de las placas NGM con agua destilada, colocados en un tubo Falcon de 15 ml mediante el uso de una pipeta automática y posteriormente centrifugados a 1200 rpm para eliminar los restos de bacterias. El

lavado consistía en retirar el sobrenadante del tubo Falcon luego de la centrifugación y volver a suspender el *pellet* de nematodos con agua destilada limpia. Se realizaron 3 lavados y luego el *pellet* de nematodos fue tratado con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 1 % e hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M durante 5 minutos. La reacción se detuvo con agua destilada, se centrifugo a 1200 rpm y se realizaron 3 lavados sucesivos. Los huevos obtenidos, que no fueron afectados por el tratamiento, se sembraron en placas de Petri conteniendo solo NMG. Al día siguiente los huevos eclosionaron y las larvas, que se mantuvieron en el estadio L1 debido a la ausencia de alimento, fueron colocadas en placas de Petri NGM sembradas con OP50. Esto permitió un desarrollo y crecimiento de los nematodos de manera conjunta y sincronizada hasta el estadio deseado para los posteriores ensayos.

Stock de nematodos

Para disponer de un *stock* de nematodos que facilite el trabajo en el laboratorio se mantuvieron poblaciones de reserva en un *freezer* a -80 °C. Para poder congelar nematodos estos deben estar en estadio larval L1 - L2, deben disponer de muy poco alimento (bacteria) en las placas de Petri, debe haber huevos como indicador de que no hubo ausencia de bacteria por periodos prolongados de tiempo y no debe haber contaminación en las placas.

Para congelar las cepas, placas de Petri NGM conteniendo larvas L1-L2 fueron lavadas con *buffer* M9 (5,8 g de Na₂HPO₄ 7H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 5 g de NaCl, 0,25 g de MgSO₄ 7H₂O y 1 litro de H₂O, esterilizado por autoclave) utilizando pipeta automática. Los nematodos fueron transferidos a tubos Falcon de 15 ml, se los centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó *buffer* M9 y *freezing solution* (5,8 g de NaCl, 50 ml de KH₂PO₄ (1 M) a pH 6, 240 ml de glicerol y 710 ml de H₂O, esterilizado por autoclave y luego se agrega 30 µL de MgSO₄ (1 M) cada 100 ml de solución) y se los transfirió a crioviales para ser posteriormente congelados.

La existencia del estadio *dauer* de resistencia permite recuperar las cepas cuando las condiciones del ambiente dejan de ser desfavorables para el crecimiento. Para la recuperación, los crioviales fueron retirados del *freezer* y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los nematodos fueron sembrados en placas de Petri NGM nuevas con bacterias. Luego de una hora las placas fueron observadas bajo microscopio estereoscópico con zoom para corroborar la supervivencia de los nematodos.

Ensayos de comportamiento

El comportamiento refleja la actividad del sistema nervioso y depende de múltiples factores como estímulos externos, experiencias pasadas, estructura neuronal y cambios en el medio interno del organismo. Por lo tanto, los ensayos de comportamiento son una herramienta útil para comprender el funcionamiento neuronal.

Los ensayos fueron llevados a cabo en función de protocolos estándar descritos en *Wormbook* (www.wormbook.org). Se emplearon diversos ensayos para estudiar el comportamiento del nematodo: movilidad en medio líquido, parálisis en placas de agar, eclosión de huevos y velocidad del bombeo faríngeo.

Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente 20 - 23 °C, se utilizaron placas de Petri con nematodos hermafroditas sincronizados en estadio adulto joven y cada individuo fue manipulado mediante el uso del *worm picker*. Esta herramienta, también llamada *pick*, fue confeccionada montando un alambre de platino de 2 cm de largo por 3 mm de ancho en una pipeta Pasteur de vidrio. La punta del *pick* no debe ser punzante ya que si es afilada puede dañar al nematodo o generar hoyos en el agar donde los nematodos se introducirán. El alambre de platino puede esterilizarse en el mechero y enfriarse rápidamente, lo cual lo hace muy útil durante los experimentos (Stiernagle, 2006). Algunos ensayos de parálisis en placa de agar fueron realizados con nematodos sincronizados en estadio larval L1. Para manipular las larvas, estas eran suspendidas en *buffer* M9 y luego colocadas mediante una pipeta automática en pequeñas gotas en las placas conteniendo las drogas en estudio.

Ensayo de movilidad en medio líquido: estos ensayos fueron realizados con el objeto de cuantificar los defectos en la movilidad de los nematodos ocasionados por diversas drogas. En los pocillos de la placa *multiwells* se colocó *buffer* M9 solo como control o junto con la droga en estudio (100/200 µl volumen final en cada uno). Con el *worm picker* se colocaron entre 1 - 3 nematodos en cada pocillo, se los expuso durante 30 minutos a las diferentes condiciones experimentales y luego se contaron los eventos de cambio de curvatura durante un minuto utilizando un microscopio estereoscópico con zoom. Se considera como un evento de cambio en la curvatura ("*single thrash*") el pasar del centro del cuerpo de un lado a la dirección opuesta (Figura 10) (Buckingham y Sattelle, 2009). Se evaluaron 20 nematodos en cada condición.

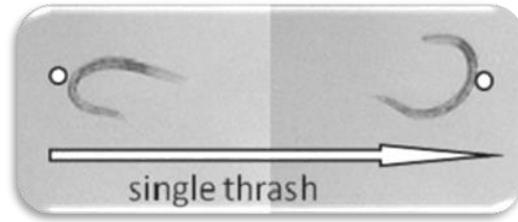


Figura 10: "Single thrash". Representación de un evento de cambio en la curvatura de un nematodo en medio líquido.

Ensayo de parálisis en placa de agar: este ensayo permite estudiar la sensibilidad de *C. elegans* al efecto paralizante de diferentes drogas. Las drogas fueron adicionadas al medio NGM líquido (50 – 55 °C) antes de ser vertido en las placas de Petri de 35 mm (Caldicott et al., 1994). Las placas se dejaron secar y fueron utilizadas al día siguiente. Aproximadamente 30 - 50 nematodos fueron colocados con el *worm picker* en cada placa de Petri conteniendo DMSO (dimetilsulfóxido) como vehículo control o las diferentes drogas en estudio (individuales o combinadas). Se monitoreó y contó el número de nematodos paralizados a diferentes intervalos de tiempo utilizando un microscopio estereoscópico con zoom. Se consideraba que un nematodo estaba paralizado cuando no respondía al tocarlo suavemente tres veces en el centro del cuerpo con una herramienta confeccionada con una pestaña. Para diseñar dicha herramienta, una pestaña fue montada sobre una aguja y se la adhirió con Parafilm. Luego la aguja con la pestaña fue adherida a un lápiz para su manipulación en los ensayos (Figura 11).

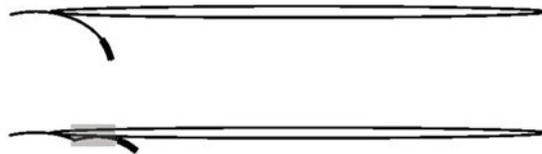


Figura 11: Utilización de una pestaña para testear la sensibilidad del nematodo a un estímulo suave. La imagen superior muestra el posicionamiento de la pestaña en la aguja y la imagen inferior su adhesión con Parafilm para confeccionar la herramienta (Imagen tomada de *Wormbook*).

1. Determinación de relaciones dosis-efecto: se realizaron ensayos para medir diferentes efectos en función de la concentración de la droga en estudio, determinar la potencia (EC_{50}) y eficacia de dicha droga. Nematodos salvajes sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en placas de agar conteniendo concentraciones crecientes de la droga en estudio. Se evaluó el porcentaje de nematodos paralizados en cada condición luego de una y dos horas de exposición. Se graficaron los resultados obtenidos utilizando *SigmaPlot 12.0*. Los datos fueron ajustados mediante la Ecuación de *Hill* para obtener el valor de EC_{50} , que

corresponde a la concentración de la droga que genera un efecto equivalente al 50 % del máximo, y el valor del efecto máximo.

$$\text{Efecto} = 1/[1 + (EC_{50}/L)^{nH}] \text{ (Ecuación de Hill)}$$

En la ecuación nH corresponde al coeficiente de Hill y L a la concentración de agonista.

Por otro lado, se estudió la concentración de droga que genera una inhibición del 50 % en el movimiento de los nematodos (*half maximal Inhibitory Concentration*, IC₅₀). Se realizaron ensayo de parálisis en placas de agar conteniendo concentraciones crecientes de la droga. Se colocaron nematodos salvajes sincronizados en estadio adulto joven y se evaluó la fracción de nematodos en movimiento a los 60, 90 y 120 minutos de exposición. Se graficaron los resultados obtenidos en *SigmaPlot 12.0* y los datos fueron ajustados con la Ecuación de Hill para obtener el valor de IC₅₀.

2. Longitud relativa del cuerpo (*Relative Body Length*, RBL): para evaluar el tipo de parálisis generada por las drogas se midió la longitud corporal de los nematodos luego de ser expuestos a dichos compuestos. Cuando la parálisis es flácida, los nematodos se ven distendidos y alargados, cuando es espástica los nematodos se encuentran contraídos y con menor longitud corporal y en la estacionaria los nematodos están paralizados sin embargo al tocarlos responden contrayendo los músculos de la pared del cuerpo. Para este ensayo, nematodos salvajes sincronizados en estadio adulto joven fueron transferidos a cada placa de Petri de 35 mm conteniendo agar y DMSO como vehículo control o agar junto con la droga en estudio. Luego de dos horas de exposición, se tomaron fotografías con una cámara digital *ToupCam UCMOS 05100KPA (Toup Tek Photonics)* montada en un microscopio estereoscópico con zoom. La RBL fue medida usando el Software *Fiji-ImageJ*. También se obtuvieron videos con la misma cámara para registrar el tipo de parálisis.

Ensayo de eclosión de huevos: este ensayo permite evaluar la toxicidad de diversas drogas, particularmente, su efecto ovicida. Aproximadamente 300 - 500 huevos fueron colocados en tubos *Eppendorf* conteniendo *buffer* M9 solo, M9 con DMSO como vehículo o con los compuestos a testear. Se los incubó durante 12 horas a 22 °C y luego se los lavó con *buffer* M9 para recuperarlos. Finalmente, se los colocó en placas de Petri nuevas con NGM solo, y se contó el número de huevos sin eclosionar y de larvas L1 utilizando un microscopio estereoscópico con zoom. Se determinó la capacidad de las diferentes drogas para inhibir la eclosión de los huevos utilizando la siguiente ecuación: número de huevos sin eclosionar/ (número de larvas que eclosionaron + número de huevos sin eclosionar).

Ensayo de velocidad del bombeo faríngeo: la contracción y relajación de la faringe del nematodo es otro comportamiento que puede ser estudiado en ausencia y presencia de diversas drogas. Para estos ensayos, las placas de Petri se prepararon de manera similar a los ensayos de parálisis en placas de agar. Se colocaron 14 nematodos salvajes sincronizados en estadio adulto joven en cada placa de Petri de 35 mm conteniendo agar y DMSO como vehículo control, o agar con la droga en estudio. Se los incubó durante 30 minutos a 20 °C. Utilizando un microscopio estereoscópico con zoom se contó el número de contracciones en el bulbo terminal o posterior de la faringe (Figura 12) por minuto.

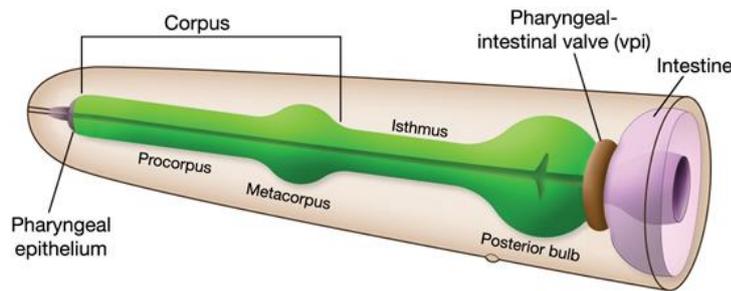


Figura 12: Esquema de la anatomía de la faringe de *C. elegans*. El primer bulbo o anterior también se denomina meracarpus, y el segundo bulbo o posterior se denomina bulbo terminal. El extremo anterior de la faringe se conecta con la cavidad bucal y el posterior con el intestino (Imagen tomada de *WormAtlas*).

Aislamiento y cultivo de células

Tanto el aislamiento como el cultivo celular son herramientas esenciales para el estudio de la función celular. El crecimiento de células aisladas bajo condiciones controladas puede ser manipulado y registrado mediante fotografías a un nivel de resolución que no es posible de realizar con animales completos ni en cultivos de tejidos (Zhang y Kuhn, 2013).

Células embrionarias

El primer paso para el aislamiento y cultivo de células embrionarias es la obtención de huevos estériles. Para ello, se expusieron nematodos hermafroditas grávidos a una solución alcalina de hipoclorito (NaOH 0,5 M y NaOCl 1 %), como se detalló anteriormente en la sincronización de nematodos, pero luego de frenar la reacción todo el resto del protocolo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, bajo flujo laminar y utilizando soluciones estériles.

Los huevos obtenidos fueron tratados con quitinasa 1 IU/ml (*Millipore Sigma Co., Louis, MO*) durante 30 – 40 minutos a temperatura ambiente en rotación para digerir la cutícula. Los

embriones fueron centrifugados a 6000 rpm y se suspendieron en medio de cultivo L-15 (*Hyclone, Logan, UT*) conteniendo 10 % de suero fetal bovino inactivado, antibióticos (ampicilina y estreptomina) y sacarosa para incrementar la osmolaridad (Christensen et al., 2002). Los embriones fueron disociados mediante disgregación mecánica con pipeta automática. Para remover los embriones no disociados y las larvas recién eclosionadas se utilizó un filtro de jeringa estéril *Durapore* de 5- μm (*EMD Millipore, Bedford, MA*). Las células recuperadas se centrifugaron a ~ 4000 rpm, se suspendieron en medio de cultivo L-15 y fueron colocadas sobre cubreobjetos en placas de Petri de 35 mm durante 2 horas. Para lograr la adherencia de las células, los cubreobjetos fueron previamente tratados con poly-O-ornitina durante 40 minutos y luego fueron lavados con agua *milli-Q* estéril 3 veces. El cultivo se mantuvo a 24 °C en un incubador con la humedad adecuada. La diferenciación de los tipos celulares (neuronal y muscular) correspondientes a un estadio larval L1, se obtuvo 24 horas después del aislamiento. Las células musculares pudieron reconocerse fácilmente debido a su forma de huso, similar a las células musculares de la pared del cuerpo *in vivo* (Christensen et al., 2002; Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012). Los registros electrofisiológicos se realizaron 1 – 5 días después de la obtención de las células.

Células correspondientes al estadio larval L2

El desarrollo de ciertos tejidos y sistemas de órganos ocurre luego de la eclosión de los huevos, y muchas células no llevan a cabo todas sus funciones hasta estadios larvales avanzados. Además, es posible que los patrones de expresión de subunidades que integran los receptores cambien durante el desarrollo del nematodo, como ocurre con los humanos (Hall y Sanes, 1993). Como los eventos de desarrollo post embrionario y los mecanismos moleculares que los controlan no pueden ser estudiados con cultivos de células embrionarias, se implementó un protocolo para extracción de células larvales (Zhang et al., 2011).

Se expusieron nematodos hermafroditas grávidos a una solución alcalina de hipoclorito (NaOH 0,5 M y NaOCl 1 %). Los huevos obtenidos fueron colocados en placas de Petri de 90 mm con NGM. Al día siguiente las larvas L1 fueron colocadas en placas de Petri de 90 mm sembradas con bacterias *E. coli* OP50 sometidas previamente a exposición a luz ultravioleta para evitar la contaminación posterior del cultivo celular. Las larvas en estadio L2 fueron utilizadas para el aislamiento celular en condiciones de esterilidad, y para ello, todo el protocolo se realizó bajo flujo laminar y con soluciones estériles. Las larvas L2 fueron levantadas con agua *milli-Q* estéril de las placas de Petri y colocadas con una pipeta automática en tubos Falcon de 15 ml. Se las

centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se volvió a colocar agua *milli-Q* estéril limpia para lavarlas (el lavado se repitió tres veces).

La cutícula de los nematodos está compuesta principalmente por colágenos y cuticulinas que se ensamblan formando complejos relativamente insolubles, y también contiene glicoproteínas (Lints y Hall, 2009). Para debilitar dicha cutícula, el *pellet* de larvas L2 fue colocado 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) durante 2 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue frenada con *Egg buffer* (12,5 ml de HEPES (1 M) a pH 7,3, 29,5 ml de NaCl (2 M), 12 ml de KCl (2 M), 1 ml de CaCl₂ (1 M), 1 ml de MgCl₂ (1 M) y 444 ml de H₂O y esterilizado por autoclave), el tubo *Eppendorf* fue centrifugado a 16000 g por 1 minuto, y se realizaron 5 lavados sucesivos (cambiando el *Egg buffer* y centrifugando cada vez). Luego se agregó pronasa E durante 7-9 minutos a temperatura ambiente. Esta enzima, capaz de digerir la capa basal de la cutícula y la cutícula de la faringe (Cox et al., 1981), es necesaria para generar la disrupción de la cutícula y la liberación de las células larvales. Durante la incubación con la enzima se utilizó una pipeta automática para lograr la disrupción mecánica. La combinación de la solución SDS-DTT, la pronasa y la pipeta automática, permiten la disociación de tejidos y la obtención de células de manera muy eficaz. Las células larvales fueron filtradas con un filtro de jeringa estéril *Durapore* de 5- μ m (*EMD Millipore, Bedford, MA*) y luego colocadas sobre cubreobjetos, previamente tratados con poly-O-ornitina, durante 24 horas (algunas células pueden requerir aún más tiempo para adherirse). Al día siguiente se les adicionó medio de cultivo L-15 con 10 % de suero fetal bovino inactivado, antibióticos (solución de ampicilina y estreptomina) y sacarosa. Dependiendo del estadio larval utilizado para el aislamiento, las células presentan diferente tamaño y morfología. Las células aisladas de nematodos en estadio L2 – L4 son más grandes que las de estadio L1, redondas y con protuberancias. Las células fueron utilizadas para realizar registros electrofisiológicos durante 1-5 días luego del aislamiento.

Cultivo de células de mamífero BOSC 23

Para la expresión heteróloga de ciertos receptores estudiados en esta Tesis se utilizaron células BOSC 23, derivadas de una línea celular conformada por células embrionarias humanas de riñón (*Human Embryonic Kidney, HEK 293*) (Pear et al., 1993). Las células fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino al 10 % y antibióticos (penicilina/estreptomina), a 37 °C en atmósfera controlada de CO₂ al 5 %.

Expresión heteróloga de receptores

Para la expresión transitoria de receptores, en primer lugar, los cDNA (*complementary DeoxyriboNucleic Acid*) de las subunidades fueron subclonados en el vector pRBG4 (Bouzat et al., 1994) o pcDNA3.1. Luego, células BOSC 23 a un 40 – 50 % de confluencia fueron incubadas durante 8 – 12 horas con un precipitado de fosfato de calcio conteniendo los cDNA correspondientes a las subunidades del receptor en estudio junto con el cDNA de la proteína fluorescente verde (GFP) (Bouzat et al., 2002). Esta proteína permite identificar células transfectadas al iluminarlas con luz ultravioleta. Se utilizaron 5 µg de cDNA por cada placa de Petri de 35 mm. Luego de la incubación con el precipitado se les cambió el medio DMEM y volvieron a ser incubadas durante 24 – 72 horas a 37 °C y 5 % de CO₂ para lograr la expresión de los receptores en la membrana celular.

1. Receptor nicotínico de acetilcolina muscular: La relación de cDNA utilizada para la transfección fue 2 α 1: 1 β : 1 ϵ : 1 δ (Bouzat et al., 1994; Bouzat et al., 2000; Bouzat et al., 2002).

2. Canal de cloruro activado por glutamato: Los cDNA que codifican para las subunidades GluCl α 1 y GluCl β , subclonados en el vector pcDNA3.1, fueron cedidos por Dr. Paas (*Laboratory of Ion Channels, The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences and The Institute of Nanotechnology and Advanced Materials, Bar-Ilan University, Ramat Gan 52900, Israel*). La relación utilizada para la transfección fue GluCl α 1 : GluCl β 1:1. GluCl α 1 contiene *gfp* entre los dominios transmembrana M3 y M4 lo cual permite reconocer las células transfectadas bajo óptica de fluorescencia sin necesidad de agregar el cDNA de la GFP (Degani-Katzav et al., 2016).

Registros de Patch-Clamp

Para obtener registros electrofisiológicos se utilizó el método de pinzamiento o parche de membrana (*“Patch Clamp”*), en dos configuraciones: *“cell-attached”* y *“whole-cell”*. Este método permite estudiar la actividad de los receptores presentes en la membrana de una célula.

Registros de canal único (corrientes unitarias)

Se realizaron registros de canal único en la configuración *cell-attached* (Figura 13) a un potencial de pipeta de -70 mV en células BOSC 23 transfectadas y -90 mV en células musculares de nematodos, a temperatura ambiente 20 - 25 °C (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012). En algunos experimentos se realizaron registros a diferentes potenciales de pipeta para estudiar la relación entre la amplitud de los canales y el voltaje aplicado.

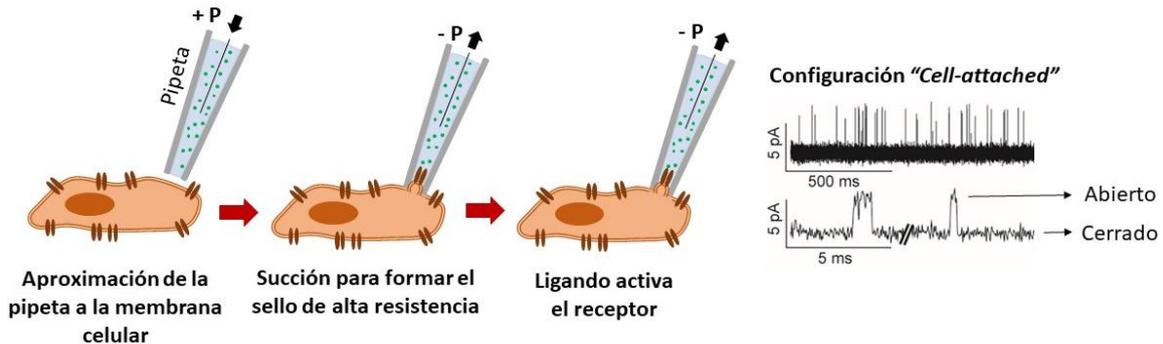


Figura 13: Configuración "cell-attached". Para la obtención del sello se aproxima una pipeta de vidrio a la célula mediante un micromanipulador bajo microscopio invertido. Luego del contacto con la célula se aplica presión negativa por succión para formar el sello de alta resistencia. La membrana no se rompe ni se separa físicamente de la célula, preservando la integridad intracelular. Mediante esta configuración, también denominada de canal único, se pudo evaluar el comportamiento de los receptores presentes en el parche. Los canales se muestran como deflexiones hacia arriba a dos escalas temporales diferentes.

Para registrar, primero se retiró el medio de cultivo de las placas de Petri de 35 mm que contenían las células transfectadas con el receptor en estudio o las células musculares de nematodos y luego se colocó una solución de baño que contenía 142 mM KCl, 5,4 mM NaCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,7 mM MgCl₂ y 10 mM HEPES a pH 7,4. La misma solución se utilizó para las pipetas.

Se utilizaron pipetas de vidrio con una resistencia de 5-7 MΩ. Estas fueron fabricadas a partir de capilares de borosilicato (*Graner Glass Co, Claremont, CA*) utilizando un equipo denominado "*Puller*" (*SUTTER INSTRUMENT, modelo P-97*). Luego fueron cubiertas con *Sylgard* (*Dow Corning, Midland, MI*) para disminuir el ruido al reducir la capacitancia del vidrio dentro de la solución de baño, y finalmente pulidas con calor para lograr un mejor sello.

Se seleccionó una célula verde bajo óptica de fluorescencia, lo cual indica, en el caso de las células de mamífero transfectadas, una alta probabilidad de que el receptor deseado esté expresado en dicha célula. En las células de nematodos, obtenidas de la cepa PD4251 que contiene *myo-3::GFP*, la fluorescencia indica que son células musculares. Mediante succión se

realizó un sello de alta resistencia (giga-ohm) entre la membrana celular y la pipeta, conteniendo la solución de pipeta junto con la droga en estudio.

Las corrientes de canal único se registraron usando un amplificador *de Patch-Clamp Axopatch 200 B* (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA), se digitalizaron a intervalos de 10 o 5 μ s con la interface PCI-6111E (National Instruments, Austin, TX), y fueron transferidas a la computadora por medio del programa *Acquire* (HEKA Instruments Inc., Bellmore, NY). Luego de digitalizarlos, los registros fueron analizados con el programa TAC 4.0.10 (Buxton Corporation, Seattle, WA) utilizando el criterio de umbral de amplitud media, con un filtro de 9 kHz.

Mediante dicho análisis se obtuvieron los histogramas de apertura y cierre de los canales, que fueron trazados usando 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 (Buxton Corporation, Seattle, WA).

Los grupos de aperturas de un canal (*clusters*) fueron identificados como una serie de aperturas sucesivas que corresponden a eventos de apertura de una misma molécula de receptor. Los *clusters* se encuentran precedidos y seguidos por cierres más largos que la duración crítica (τ_{crit}). La duración crítica fue obtenida mediante el punto de inserción de componentes en el histograma de estado cerrado (Gumilar et al., 2003; Corradi et al., 2009).

1. Determinación de la conductancia del canal

Para determinar la conductancia de un canal activado por su agonista o por una droga determinada, se registraron corrientes de canal único activadas por la molécula en estudio en un rango de potenciales de pipeta (70, 100 y 120 mV). Se analizó la amplitud de los canales en cada potencial y se construyeron relaciones corriente-voltaje. Utilizando *SigmaPlot 12.0* se graficaron las diversas amplitudes en función del potencial de pipeta aplicado. Los resultados obtenidos fueron ajustados mediante regresión lineal y a partir de la pendiente de la gráfica se obtuvo el valor de la conductancia del canal.

$$V = I \cdot R \rightarrow I = V \cdot 1/R$$

En la ecuación I es la amplitud del canal (pA), V es el potencial de pipeta (mV) y $1/R$ es la pendiente de la recta, que indica la conductancia del canal (pS).

2. Obtención de k_{+b} (velocidad de bloqueo del canal)

Siguiendo el esquema lineal de bloqueo de canal abierto, se graficó en *SigmaPlot 12.0* la inversa del tiempo medio de estado abierto del canal en función de la concentración de droga utilizada, y se obtuvo una relación lineal. Mediante un análisis de regresión lineal, se determinó el valor de la pendiente y se estimó la constante de bloqueo k_{+b} .

Registros de corrientes macroscópicas

Las corrientes macroscópicas generadas por un pulso de agonista fueron registradas en configuración *whole-cell* (Figura 14) a 22 °C y a un potencial de pipeta de 50, -50 y -60 mV en las células BOSC 23 y a -70 mV en las células musculares de *C. elegans*. Para los registros realizados con células BOSC 23, la solución de pipeta (*IntraCellular Solution, ICS*) contenía KCl 134 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM a pH 7,3. La solución extracelular (*ExtraCellular Solution, ECS*) que se colocó en la cápsula con las células, contenía NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,5 mM y HEPES 10 mM a pH 7,4. Para los registros realizados con células musculares de *C. elegans* la ICS contenía KCl 134 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM a pH 7,3, y la ECS NaCl 140 mM, CaCl₂ 3 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, glucosa 11 mM y HEPES 5 mM a pH 7,4.

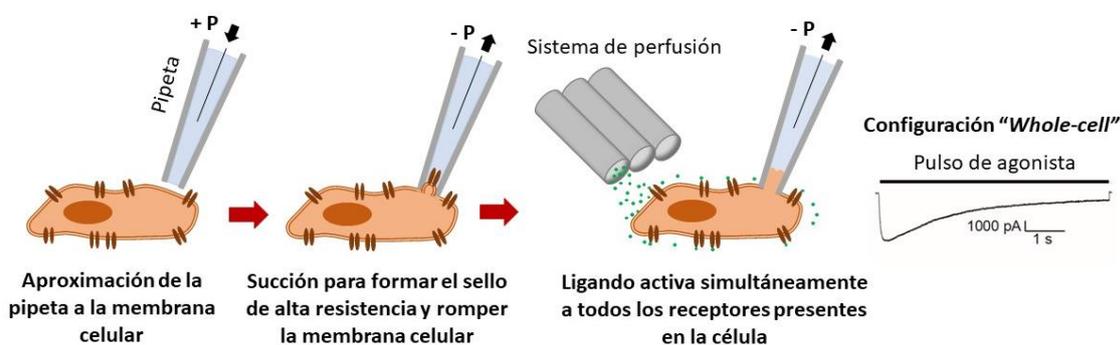


Figura 14: Configuración *whole-cell* o célula entera. Se genera una ruptura física en la membrana celular mediante la aplicación de presión negativa desde una configuración *cell-attached* generando un acceso al interior de la célula. Esta configuración permite estudiar la actividad conjunta de todos los canales presentes en la membrana de la célula representada como corrientes macroscópicas. La droga en estudio se aplicó en el ECS sobre las células a través de una serie de pulsos y utilizando un sistema de perfusión que permite el intercambio rápido de soluciones.

El sistema de perfusión de soluciones de la configuración *whole-cell* está formado por tres mangueras conectadas, en un extremo, a reservorios elevados por encima del sistema experimental para que las soluciones contenidas en su interior fluyan por gravedad. En el otro extremo, las tres mangueras se conectan a tres tubos que se colocan dentro de la cápsula de cultivo cerca de las células. La salida de las soluciones a la cápsula está controlada por un sistema

de válvulas (*VC3 controller, ALA Scientific*). Por uno de los tubos perfunde continuamente ECS sin droga. Cuando se aplica un pulso, la válvula se abre permitiendo la salida de la solución con droga por uno de los otros dos tubos, cerrando momentáneamente al primero por el tiempo que dure el pulso. Este sistema permite el intercambio rápido de soluciones de 0,1 a 1 ms, lo cual hace posible la activación de todos los receptores presentes en la célula y la obtención de las corrientes macroscópicas.

Para ubicar el sistema de perfusión en la posición adecuada que permita la activación simultánea de todos los receptores presentes en la célula se llevó a cabo el método de “*open pipette*”. Este permite estimar el tiempo de intercambio de soluciones (Dilger y Liu, 1992). Consiste en aplicar un pulso de ECS diluido al 50 % a una pipeta abierta (sin realizar un sello), lo cual produce un cambio repentino en la corriente que es 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 (Corradi, 2009; Andersen et al., 2016).

Se seleccionó una célula verde bajo óptica de fluorescencia, lo cual indica una alta probabilidad de que el receptor deseado exprese en dicha célula, y se la ubicó en la posición elegida según el método de “*open pipette*” para lograr un intercambio rápido de soluciones (0,1 – 1 ms). 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. 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 fueron filtradas a 5 kHz y digitalizadas a 20 kHz usando un amplificador de *Patch-Clamp Axopatch 200 B (Molecular Devices, CA, USA)* (Gumilar et al., 2003; Corradi et al., 2009), y adquiridas usando el *software WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, UK)*.

Los registros fueron analizados usando el *software ClampFit (Molecular Devices, CA, USA)*. Las caídas de las corrientes fueron ajustadas mediante una función mono-exponencial simple teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$I(t) = I[\exp(-t/\tau)] + I_{\infty}$$

En la ecuación t representa tiempo, I es el pico de corriente, I_{∞} es la corriente en estado estacionario y τ es la constante de tiempo de decaimiento de la corriente. La carga neta fue

calculada mediante integración de la corriente (Papke y Porter Papke, 2002; Andersen et al., 2016).

1. Curva Corriente macroscópica-Voltaje

Para construir una curva I/V (corriente macroscópica vs voltaje) se midió el pico de las corrientes generadas por pulsos de ECS conteniendo el agonista a diferentes potenciales de membrana (-100, -80, -60, -40, -20, 0, 20, 40, 60, 80 y 100 mV). Se normalizaron las corrientes en función del pico de corriente máximo (-100 mV) y se promediaron los resultados obtenidos de varias células. Finalmente se graficaron las corrientes ($I/I_{m\acute{a}x}$) en función del voltaje aplicado y los puntos obtenidos fueron ajustados mediante regresión lineal utilizando *SigmaPlot 12.0*.

2. Protocolos de aplicación de drogas

Para estudiar los efectos de las drogas pueden utilizarse diferentes protocolos de aplicación con el fin de determinar el efecto en función del estado conformacional del receptor. La droga puede aplicarse antes del pulso de agonista (preincubación o +/-) para determinar si la droga interactúa con el estado conformacional cerrado del receptor o junto al agonista (co-aplicación o -/+) para determinar si la droga interactúa con el estado conformacional abierto del receptor.

Protocolo de preincubación (+/-)

Se empleó un protocolo de doble pulso que consistía en aplicar un pulso de ECS conteniendo el agonista del receptor en estudio y registrar la corriente control. Luego, realizar una incubación con ECS conteniendo la droga a evaluar (sin agonista), aplicar otro pulso de ECS conteniendo el agonista y registrar la segunda corriente tratada.

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

Se aplicaron tres pulsos de ECS conteniendo el agonista del receptor, cada uno separado del pulso siguiente por lavados con ECS solo, y se registraron las corrientes control. Luego, en la misma célula, se aplicaron tres pulsos de ECS conteniendo el agonista del receptor junto con la droga en estudio, cada uno separado del pulso siguiente por lavados con ECS solo, y se registraron las corrientes tratadas.

Protocolo de activación

Se aplicaron pulsos de ECS conteniendo la droga en estudio para evaluar si podía actuar como agonista y activar a los receptores presentes en la membrana de la célula registrada.

Para todos los protocolos, los tiempos de aplicación de agonistas y de las drogas en estudio, como así también los potenciales de pipeta aplicados, variaron en función del tipo celular y del receptor utilizados para los registros. Se evaluaron diversos parámetros de las corrientes tratadas en función de las corrientes control: pico, carga neta (área) y velocidad de decaimiento de las corrientes (τ_d).

Modelado molecular y *docking*

Se crearon modelos homólogos al dominio extracelular de dos subunidades adyacentes usando la estructura del receptor nicotínico humano $\alpha 4\beta 2$ unido a nicotina (*Protein Data Bank code 5KXI*, Morales-Perez et al., 2016) y la quimera $\alpha 7$ /AChBP cristalizada con el agonista parcial lobelina que contiene el *loop* C parcialmente cerrado (PDB 5AFM, Spurny et al., 2015).

La secuencia de aminoácidos fue alineada usando *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y el modelado fue realizado usando *MODELLER 9.19* (<https://salilab.org/modeller/>) (Sali et al., 1995).

Se testeó el *docking* del ligando en interfaces del nAChR de ratón $\alpha 1/\epsilon$ y $\alpha 1/\delta$, y en 10 interfaces de subunidades diferentes del L-AChR usando los dos modelos diferentes para cada interfase. ACh y befenio fueron obtenidos de *PubMed database*. Para realizar el *docking* se utilizó el programa *AUTODOCK 4.2* (Morris et al., 2009). Un centenar de algoritmos fueron realizados para cada condición. El *clustering* de los resultados fue realizado con *AUTODOCK* sobre la base de un corte de desviación cuadrática media de 2 Å. Para evaluar la capacidad de cada interface de unir el agonista, se comparó la mejor energía de unión (*Best Binding Energy*, BBE) y la frecuencia de conformaciones que unen al agonista en la orientación correcta en el bolsillo de unión. Los resultados de *docking* fueron corroborados en dos procedimientos diferentes y el *docking* más representativo fue graficado con *Discovery Studio Visualizer 4.5* (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, 2016).

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 utilizó la cepa PD4251 que expresa GFP en todas sus células musculares (Fire et al., 1998).

Drogas

Las drogas utilizadas en esta Tesis fueron: Acetilcolina (ACh), Levamisol, Befenio, Timol, Carvacrol, Eugenol, Piperazina, Ivermectina (IVM), Ácido γ -aminobutírico (GABA), dimetilsulfóxido (DMSO), y Sal monosódica monohidratada de ácido L-glutámico (glutamato) de Sigma – Aldrich Co. (Merk KGaA, Darmstadt, Germany). La Doxepinona (Dibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ona) fue sintetizada en el Instituto de Química del Sur (INQUISUR) (Scoccia et al., 2017).

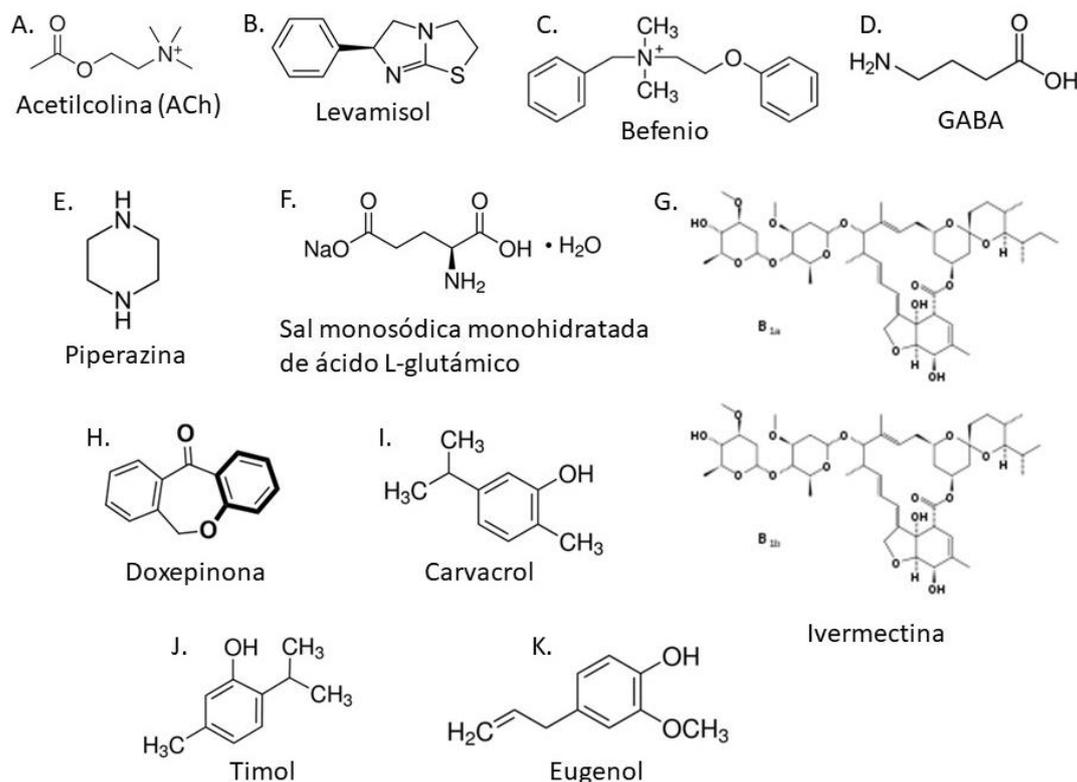


Figura 15: Estructura química de agonistas y moduladores de los receptores estudiados en esta Tesis.

A-C Agonistas de nAChRs. D-E Agonistas de GABAR. F-G Agonistas de GluCl_s. H Antagonista de GluCl_s. I-K Moduladores de nAChR y GABAR.

Estadística

Los datos experimentales se expresaron como el promedio (media aritmética) \pm desvío estándar (DE) del número de datos indicado (n). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas usando el *test t* de *Student* de dos colas para muestras apareadas, o ANOVA simple con el *post test* Bonferroni para comparaciones múltiples. En todos los casos se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad. La significancia estadística fue establecida a valores de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Todos los *test* estadísticos fueron realizados usando *SigmaPlot 12.0* (*Systat Software, Inc*).



CAPÍTULO I

**ACCIONES MOLECULARES DEL ANTIPARASITARIO BEFENIO
SOBRE EL RECEPTOR NICOTÍNICO SENSIBLE A LEVAMISOL DE
CAENORHABDITIS ELEGANS Y EL RECEPTOR NICOTÍNICO
MUSCULAR DE VERTEBRADOS**

CAPÍTULO I: ACCIONES MOLECULARES DEL ANTIPARASITARIO BEFENIO SOBRE EL RECEPTOR NICOTÍNICO SENSIBLE A LEVAMISOL DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* Y EL RECEPTOR NICOTÍNICO MUSCULAR DE VERTEBRADOS.**Introducción**

La prevalencia de infecciones ocasionadas por helmintos tanto en humanos como en animales permanece muy alta, por lo tanto, son necesarios esfuerzos concentrados en esta área de investigación. El nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* ha emergido como un sistema modelo muy útil para el *screening* de drogas antihelmínticas porque comparte características fisiológicas y farmacológicas con nematodos parásitos, no es más diferente a un nematodo parásito de lo que cada especie parásita lo es de otras, y es sensible a la mayoría de las drogas antihelmínticas (Holden-Dye y Walker, 2007).

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) presentan roles claves en la contracción muscular y locomoción tanto en vertebrados como invertebrados, y además son blancos moleculares de agentes antihelmínticos.

En vertebrados existen 17 subunidades que generan una gran variedad de nAChRs. El nAChR muscular de mamíferos está formado por cuatro subunidades diferentes $\alpha 1$, $\beta 1$, δ y γ/ϵ dependiendo si corresponde a un músculo embrionario o adulto respectivamente, con una composición $(\alpha 1)_2\beta\delta \gamma/\epsilon$. Estos receptores cuentan con dos sitios de unión al agonista en las interfases de subunidades $\alpha 1/\delta$ y $\alpha 1/\gamma$ o ϵ .

C. elegans posee una familia muy extensa de genes que codifican para diversas subunidades que componen los nAChRs (Jones et al., 2007; Jones y Sattelle, 2008). En la unión neuromuscular del nematodo, los principales nAChRs presentes son: el receptor nicotínico de acetilcolina sensible a nicotina (N-AChR) y el receptor nicotínico de acetilcolina sensible a levamisol (L-AChR) (Richmond y Jorgensen, 1999). El L-AChR es el blanco molecular de agentes nematocidas como levamisol y pirantel que actúan como potentes agonistas, producen hipercontracción de los músculos de la pared del cuerpo del nematodo, parálisis y finalmente la muerte. El L-AChR está compuesto por tres subunidades esenciales (UNC-63, UNC-38 y UNC-29) y dos no esenciales (LEV-8 y LEV-1) (Boulin et al., 2008; Hernando et al., 2012). La disposición de las cinco subunidades en el arreglo pentamérico permanece desconocida.

ACR-8 es una subunidad homóloga a LEV-8 (Mongan et al., 1998). En *C. elegans* está presente en músculo (Touroutine et al., 2005), actúa como una subunidad auxiliar del L-AChR y ha sido postulado que ACR-8 podría reemplazar a LEV-8 en su ausencia (Hernando et al., 2012).

Los nematodos parásitos contienen subunidades del nAChR que muestran importantes similitudes con las subunidades de *C. elegans*. Los receptores presentes en el músculo del nematodo de vida libre poseen una composición fija de subunidades, mientras que el músculo de nematodos parásitos presenta una mayor diversidad de nAChRs debido a la duplicación de subunidades y a diferentes arreglos de las subunidades ortólogas (Qian et al., 2006 ;Boulin et al., 2008; 2011; Buxton et al., 2014; Duguet et al., 2016; Verma et al., 2017). En diferentes especies parasíticas, se han descrito diversos subtipos de nAChRs: L-, N-, P- (pirantel), M- (morantel) y B- (befeño) (Martin et al., 1996; Robertson et al., 2002; Qian et al., 2006; Verma et al., 2017).

En el caso de *Ascaris suum*, en un principio se creía que contaba, al igual que *C. elegans*, con dos poblaciones de receptores nicotínicos en la membrana de las células musculares de la pared del cuerpo: un subtipo N sensible preferentemente a nicotina y un subtipo L sensible preferentemente a levamisol. Estudios posteriores demostraron que existe un tercer tipo de receptores nicotínicos en dicho parásito, el subtipo B, sensibles preferentemente a befeño (Martin et al., 1996; Robertson et al., 2002). Sin embargo, son necesarios más estudios para comprender en detalle el B-AChR (Levandoski et al., 2005).

Befeño es un antihelmíntico colinérgico que se introdujo en el mercado en 1959 para tratar anquilostomas que afectan tanto al hombre como a perros, y a nematodos parásitos gastrointestinales de ovejas. Es miembro de la clase de drogas amonio cuaternario altamente ionizadas, y a diferencia de levamisol y pirantel, su modo de acción es poco conocido (Burrows, 1958; Copp et al., 1958; Young et al., 1958). Estudios realizados con el parásito *H. contortus* indican que la subunidad Hco-ACR-8 estaría involucrada en el sitio de unión de befeño (Charvet et al., 2012).

Se ha demostrado que *C. elegans* cuenta con dos tipos farmacológicamente diferentes de nAChRs en la musculatura somática. Quizás esto sea producto de diferencias presentes entre especies distintas, o a la existencia de un tipo de receptor sin identificar en *C. elegans* que aún debe ser determinado (Trailović et al., 2015).

Objetivo general

El objetivo general de este Capítulo fue establecer si befenio actúa como una droga paralizante en *C. elegans*, si los subtipos de nAChRs se encuentran conservados dentro del Filo Nematoda e identificar la existencia o no de un receptor específico de befenio en *C. elegans*.

Objetivos específicos

- Determinar, mediante ensayo de parálisis en placa de agar, si *C. elegans* es sensible a befenio. Describir su acción específica sobre el comportamiento del nematodo de vida libre.

- Establecer, mediante ensayos de comportamiento con mutantes nulos, el blanco molecular responsable de la acción de befenio.

- Analizar el efecto de befenio, tanto a nivel de comportamiento como a nivel de canal único, sobre una cepa mutante que carece de la subunidad LEV-8 en el arreglo pentamérico del L-AChR y en su lugar contendría ACR-8, imitando a un receptor de nematodo parásito.

- Estudiar mediante ensayos de comportamiento la acción de drogas combinadas utilizando befenio junto con levamisol, como estrategia para evitar la adquisición de resistencia en nematodos parásitos.

- Corroborar el blanco molecular de befenio mediante registros de canal único utilizando cultivos de células musculares correspondientes al estadio larval L1 del nematodo y caracterizar su actividad.

- Comprobar mediante registros de canal único si befenio reconoce diferentes blancos moleculares en diversos estadios de desarrollo del nematodo.

- Testear, mediante registros de canal único, el efecto de la droga antihelmíntica sobre receptores nicotínicos de mamíferos expresados en células BOSC 23, para tener una noción de la selectividad y las posibles consecuencias de su actividad en el hospedador del parásito.

- Comprender mediante estudios de *docking* molecular como befenio puede activar en forma diferencial nAChRs de *C. elegans* y de mamíferos al unirse al sitio de unión ortostérico del agonista.

Desarrollo y Resultados

Efectos de befenio en el comportamiento de *C. elegans*

Para comenzar con el estudio de esta droga antihelmíntica se evaluó la sensibilidad de *C. elegans* a la misma. Se estudió el efecto de befenio sobre patrones de comportamiento y para ello se llevó a cabo un ensayo de parálisis en placas de agar. Entre 30-50 nematodos salvajes (cepa N2) hermafroditas sincronizados en estadio adulto joven fueron expuestos durante una hora a concentraciones crecientes de la droga y se registró el porcentaje de nematodos en movimiento. Los resultados obtenidos se compararon con la condición control que carecía de befenio y contaba con la cantidad correspondiente del vehículo utilizado, dimetilsulfóxido (DMSO). Se determinó que befenio genera una disminución en el porcentaje de nematodos en movimiento en función de la concentración de droga utilizada. Se realizó una curva dosis-respuesta mediante la gráfica del porcentaje de nematodos en movimiento en función del logaritmo de la concentración de befenio. Se graficaron los resultados obtenidos en *SigmaPlot 12.0*, los datos fueron ajustados mediante la Ecuación de *Hill* y se obtuvo la concentración de la droga que genera una inhibición del 50 % (IC_{50}) que fue de 2,2 mM (Figura 16).

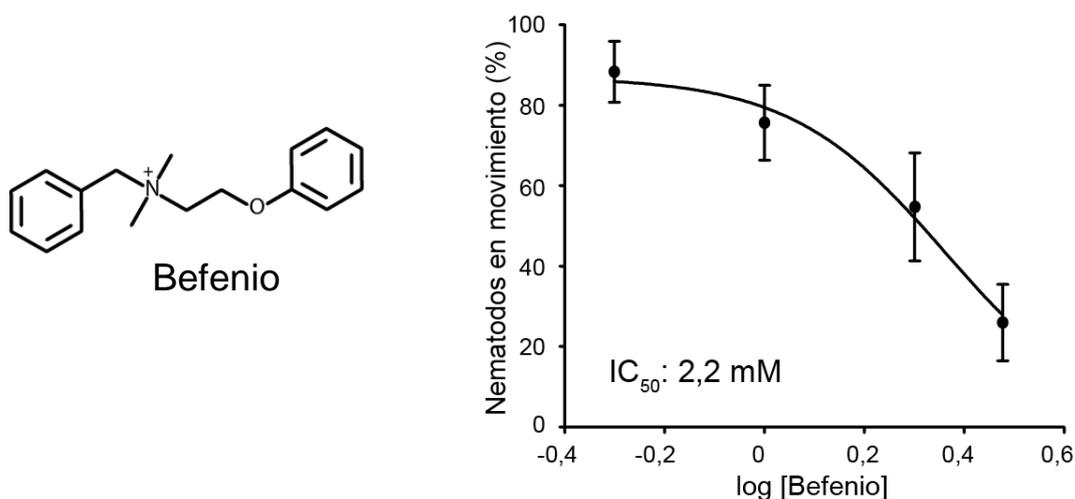


Figura 16: Izquierda: estructura química de befenio. Derecha: curva dosis-respuesta para el efecto paralizante de befenio en nematodos salvajes (cepa N2) luego de una hora de exposición. El porcentaje de animales paralizados fue comparado con la condición control sin befenio y con la cantidad correspondiente de DMSO. Los valores obtenidos representan porcentajes promedio \pm desvío estándar de cinco placas por condición.

Las drogas antihelmínticas pueden generar diversos tipos de parálisis en los nematodos: parálisis flácida, en la que los nematodos se ven distendidos y alargados; parálisis espástica en

la cual los nematodos se encuentran contraídos y con menor longitud, y parálisis estacionaria en la que los nematodos están paralizados sin embargo al tocarlos responden contrayendo los músculos de la pared del cuerpo.

Mediante la observación bajo microscopio estereoscópico con zoom de los nematodos expuestos a befenio en los ensayos de parálisis en placa de agar antes mencionados, se determinó que la parálisis generada por la droga es espástica dado que los nematodos se encontraban contraídos. Este efecto es similar al mediado por estimulación de nAChRs con agentes antihelmínticos como el levamisol (Lewis et al, 1980; Rand, 2007).

Identificación del blanco molecular de acción mediante *screening* con nematodos mutantes

Uno de los principales blancos de acción de drogas antiparasitarias es el receptor nicotínico sensible a levamisol (L-AChR). Por ello, mediante ensayos de parálisis en placa de agar, se testeó el efecto de befenio en la cepa mutante CB904 (*unc-38(e264) I*) que carece de la subunidad UNC-38, esencial para el L-AChR (Fleming et al., 1997; Richmond y Jorgensen, 1999; Culetto et al., 2004). El *screening* se basa en la hipótesis de que la ausencia del receptor blanco generará resistencia a la droga y, por lo tanto, el nematodo mutante no será paralizado o lo hará en menor grado en presencia de la droga.

La cepa PD4251 (*ccls4251 I; dpy-20(e1282) IV*) que expresa GFP en músculo fue utilizada como control en muchos experimentos ya que su comportamiento fue idéntico al observado en la cepa salvaje N2.

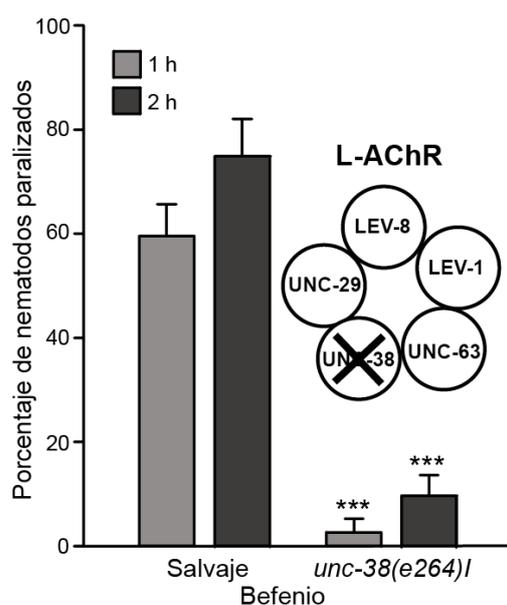


Figura 17: Comparación del porcentaje de nematodos salvajes (con L-AChRs) y mutantes (*unc-38(e264) I*, sin L-AChRs) paralizados luego de la exposición a befenio 3 mM durante 1 y 2 horas. Los valores representan los porcentajes promedio \pm desvío estándar derivados de 7 placas por condición (2 ensayos simultáneos para las dos condiciones, realizados en días separados). El símbolo *** indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición salvaje ($p < 0,001$).

Al exponer la cepa mutante CB904 (*unc-38(e264) I*) a befenio 3 mM, se encontró que la droga paralizaba un $3 \pm 2,7$ % de los nematodos luego de una hora de exposición y un $9,71 \pm 3,95$ % luego de las dos horas. En cambio, al exponer la cepa salvaje PD4251, que contiene L-AChRs funcionales, a la misma concentración de la droga se observó un $59,57 \pm 6,08$ % de nematodos paralizados a la hora de exposición y un $74,86 \pm 7,17$ % a las dos horas ($n > 25$ nematodos por placa, $n = 7$ placas por condición).

Como muestra la Figura 17, los nematodos mutantes CB904 (*unc-38(e264) I*) que carecen de L-AChRs funcionales fueron resistentes a befenio. Por lo tanto, con estos resultados se demostró que el L-AChR es el blanco molecular involucrado en la actividad paralizante de befenio.

La subunidad ACR-8 del L-AChR de *C. elegans* no mediaría la sensibilidad a befenio

En reportes previos realizados por otros autores, se propuso que la subunidad nicotínica ACR-8 presente en el nematodo parásito *Haemonchus contortus*, es esencial para la sensibilidad a befenio (Charvet et al., 2012). *C. elegans* también posee en sus músculos una subunidad auxiliar ACR-8, la cual no estaría incorporada en el receptor L-AChR nativo, pero sería capaz de reemplazar a la subunidad LEV-8 en su ausencia (Hernando et al., 2012). Para determinar si la subunidad ACR-8 presenta selectividad por befenio, se estudió la acción de la droga en la cepa mutante ZZ15 (*lev-8(x15) X*) que carece de la subunidad LEV-8 y podría contener ACR-8 en el arreglo pentamérico de los L-AChRs, imitando un receptor de nematodo parásito (Hernando et al., 2012).

Nematodos salvajes PD4251 (L-AChRs salvajes) y mutantes ZZ15 (L-AChRs sin LEV-8) hermafroditas sincronizados en estadio adulto joven fueron expuestos a befenio 1 mM en un ensayo de parálisis en placa de agar. El porcentaje de parálisis registrado en la cepa mutante fue $6,27 \pm 4,67$ % a la hora de exposición y $8,65 \pm 7,09$ % a las dos horas de exposición, mientras que en la cepa salvaje el porcentaje de parálisis fue de $16,49 \pm 8,09$ % y $25,43 \pm 15,98$ % a la hora y a las dos horas de exposición respectivamente ($n > 30$ nematodos en cada placa, $n = 8$ placas por condición, 2 ensayos simultáneos para las dos condiciones realizados en días diferentes). Tanto a la hora como a las dos horas de exposición, las diferencias entre el porcentaje de nematodos salvajes y mutantes paralizados fueron estadísticamente significativas ($p = 0,008$ y $p = 0,017$ para una y dos horas respectivamente). Con estos resultados, se puede concluir en que la cepa mutante es parcialmente resistente a befenio (menos sensible), como se observó previamente para levamisol (Hernando et al., 2012). Por lo tanto, en *C. elegans*, a diferencia de lo que sucede en *H. contortus*, la subunidad ACR-8 no mediaría la sensibilidad a befenio.

Efecto paralizante de la acción de drogas combinadas

El uso de drogas combinadas es una estrategia farmacológica muy utilizada para evitar la generación de cepas resistentes (Kaplan, 2004). Por este motivo se decidió estudiar la acción paralizante de una combinación compuesta por befenio y levamisol.

Para determinar el efecto de befenio sobre la acción paralizante de levamisol, se realizaron ensayos de parálisis en placas de agar conteniendo befenio 1 mM, levamisol 0,03 mM o befenio 1 mM junto con levamisol 0,03 mM, y se evaluó el porcentaje de nematodos paralizados a la hora y a las dos horas de exposición. Las concentraciones utilizadas para ambas drogas correspondían a sus valores de IC_{50} .

Se encontró que un $79,69 \pm 13,04$ % (1 hora) y un $90,93 \pm 10,08$ % (2 horas) de nematodos fueron paralizados por la combinación de las drogas, mientras que un $38,01 \pm 9,75$ % (1 hora) y un $72,78 \pm 10,98$ % (2 horas) de individuos fueron paralizados en presencia de levamisol y un $29,73 \pm 6,62$ % (1 hora) y $54,33 \pm 9,67$ % (2 horas) en presencia de befenio (Figura 18) ($n = 6$ placas para cada condición, con 30 nematodos por cada placa).

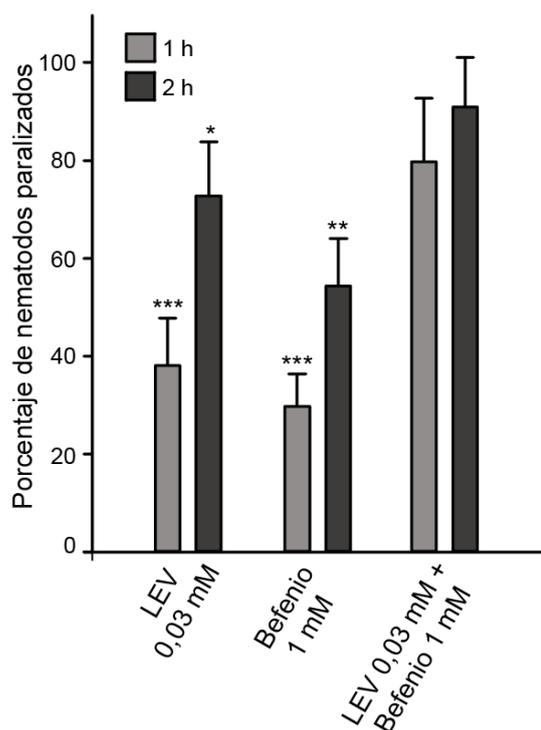


Figura 18: Porcentaje de nematodos paralizados expuestos a levamisol 0,03 mM, befenio 1 mM o ambas drogas combinadas, durante 1 y 2 horas. Los valores representan los porcentajes promedio \pm desvío estándar derivados de 6 placas para cada condición (2 ensayos simultáneos para todas las condiciones realizados en días separados). La comparación estadística se realizó entre la combinación de drogas y las drogas individuales (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$).

Evaluando el porcentaje de nematodos paralizados en todas las condiciones, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la combinación de drogas y cada droga individual ($p < 0,001$). En función de los resultados obtenidos en los ensayos de comportamiento el efecto de ambas drogas combinadas se manifestó como aditivo, lo cual

sugiere que tanto levamisol como befenio estarían actuando sobre el mismo blanco molecular, el L-AChR.

Befenio activa L-AChRs de las células musculares de larvas L1 de *C. elegans*

Para determinar el blanco molecular de befenio, se realizaron registros de canal único en configuración *cell-attached* utilizando cultivos de células embrionarias que *in vitro* se diferencian en células correspondientes al estadio larval L1 (Christensen et al., 2002). Para poder identificar fácilmente las células musculares en cultivo, éstas fueron aisladas a partir de la cepa PD4251 que produce GFP en los músculos de la pared del cuerpo.

Se realizaron sellos de alta resistencia entre pipetas de vidrio conteniendo en su interior la droga a testear y células verdes bajo óptica de fluorescencia. Posteriormente se obtuvieron los registros electrofisiológicos.

El Laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular del INIBIBB ya ha realizado la identificación de la actividad del L-AChR generada por ACh y levamisol utilizando cultivos primarios de células L1 aisladas de *C. elegans* (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012). Los canales correspondientes al L-AChR aparecen como eventos de apertura breves, en general aislados, de una amplitud aproximada de 3 pA a un potencial de pipeta de 100 mV (Figura 19). Los eventos de apertura de este receptor son detectados fácilmente en presencia de ACh (0,1-300 μ M) o levamisol (0,1-100 μ M), pero no son detectadas en ausencia de agonista ni en cepas mutantes que carecen de subunidades esenciales del L-AChR (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012).

Se encontró que befenio 50 μ M genera corrientes de canal único en células musculares L1 semejantes a las detectadas en presencia de ACh (Figura 19). No se detectaron aperturas de canales en ausencia de la droga antiparasitaria y del agonista (n = 6). La actividad de canal único generada por befenio a 100 mV potencial de pipeta mostró poblaciones homogéneas de eventos de apertura de $3,56 \pm 0,62$ pA (n = 20). Las aperturas aparecían principalmente como eventos aislados y en menor frecuencia como episodios de activación cortos compuestos por dos o más aperturas, a los que se llamó *bursts*. La frecuencia de actividad fue constante durante todo el registro (al menos durante 10 minutos de registro) (Figura 19).

El patrón de actividad del canal y la amplitud de los eventos de apertura fueron semejantes a los de L-AChRs activados por ACh (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012). En presencia de ACh 50 μ M la actividad de estos canales se caracterizó por eventos de apertura con alta frecuencia. Como sucedió con befenio, los eventos de apertura activados por ACh

ocurrieron principalmente de manera aislada o en *bursts* cortos (Figura 19) y la actividad permaneció constante al menos durante 7 minutos de registro, tal como se describió anteriormente (Hernando et al., 2012).

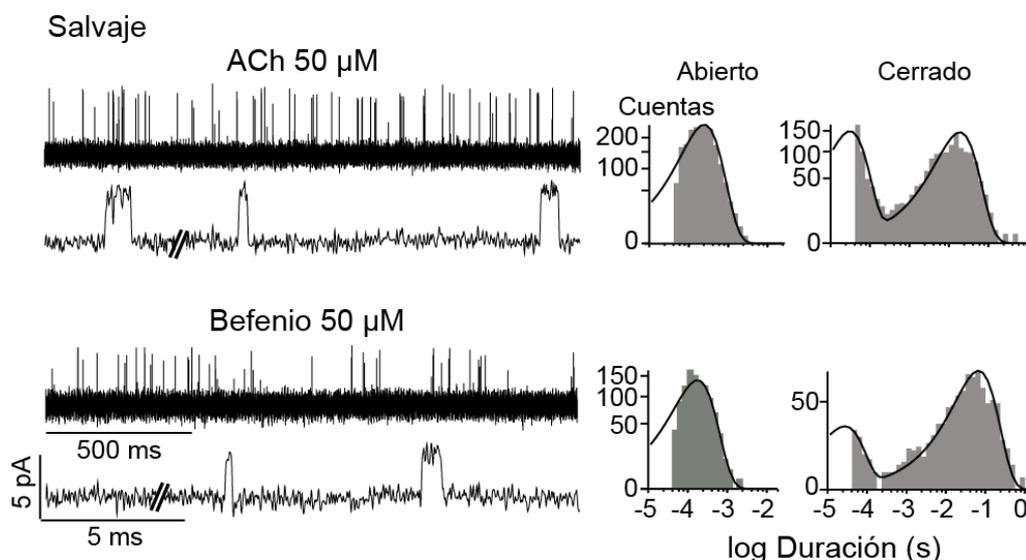


Figura 19: L-AChRs activados por ACh y befenio. Izquierda: actividad de canal único en presencia de ACh o befenio 50 μM en células musculares de larva L1 aisladas de la cepa salvaje PD4251, a dos escalas temporales diferentes. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba. Potencial de pipeta: 100 mV. Derecha: histogramas representativos del tiempo de estado abierto y cerrado del canal para cada condición.

En presencia de ACh, la amplitud de los canales registrados a 100 mV potencial de pipeta fue de $3,92 \pm 0,39$ pA ($n = 8$), indicando que no hay diferencia estadísticamente significativa con respecto a los canales activados por befenio ($p = 0,132$).

Para determinar si la conductancia de los canales activados por befenio era igual a la de los L-AChRs activados por ACh, se registraron corrientes de canal único activadas por befenio en un rango de potenciales de pipeta (70, 100 y 120 mV). Se analizó la amplitud de los canales en cada potencial y se construyeron relaciones corriente-voltaje. Utilizando *SigmaPlot 12.0* se graficaron las diversas amplitudes en función del potencial de pipeta aplicado. Los resultados obtenidos fueron ajustados mediante regresión lineal y a partir de la pendiente de la gráfica se obtuvo el valor de la conductancia. La conductancia de canal único determinada para befenio fue de $34,8 \pm 0,2$ pS (Figura 20), similar a la determinada previamente para ACh ($35 \pm 1,2$ pS (Hernando et al., 2012)), lo cual sugiere nuevamente que los canales activados por la droga antiparasitaria fueron los L-AChRs.

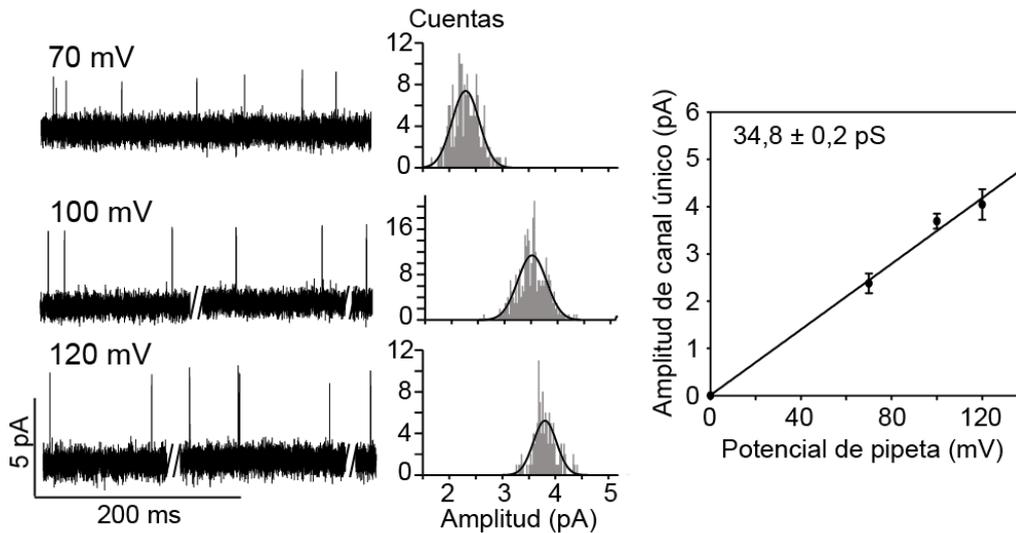


Figura 20: Izquierda: actividad de canal único registrada en células musculares de larva L1, en presencia de befenio $30 \mu\text{M}$ a diferentes potenciales de pipeta (70, 100 y 120 mV) y filtrado a 9 kHz. Las aperturas de los canales fueron representadas como deflexiones hacia arriba. Centro: histogramas de amplitudes correspondientes a cada potencial. Derecha: relación corriente-voltaje. Cada punto corresponde a un valor promedio \pm desvío estándar de tres registros diferentes para cada condición. La conductancia fue obtenida mediante un análisis de regresión lineal.

Para confirmar los resultados obtenidos se realizaron registros de canal único en células musculares de larvas L1 obtenidas a partir de la cepa mutante CB904 (*unc-38(e264) I*). Esta cepa carece de la subunidad esencial UNC-38 y por lo tanto no posee L-AChRs funcionales. Por este motivo no es posible detectar actividad de canal único en estas células que carecen de L-AChRs en presencia de ACh $50 \mu\text{M}$, tal como se describió previamente en (Rayes et al., 2007). Resultó interesante que tampoco se detectó actividad de canal único cuando se aplicó befenio $50 \mu\text{M}$ como agonista ($n = 10$).

Este resultado se corresponde con los resultados obtenidos en los ensayos de comportamiento previamente descritos, indicando que la cepa que carece de L-AChRs funcionales es resistente a befenio. Por lo tanto, la actividad de los canales generada por befenio corresponde a los L-AChRs.

Por otro lado, se evaluó si los L-AChRs, que en ausencia de la subunidad LEV-8 contendrían la subunidad ACR-8, podían ser activados por befenio. Para ello se realizaron registros de canal único en células L1 obtenidas de la cepa mutante ZZ15 (*lev-8(x15) X*). Como muestra la Figura 21, la actividad de L-AChRs en presencia de befenio $30 \mu\text{M}$ fue fácilmente detectable. La diferencia entre la duración del estado abierto de los canales activados por

befenio ($0,36 \pm 0,16$ ms, $n = 3$) y la de los registros realizados con el agonista ACh no fue estadísticamente significativa ($0,30 \pm 0,07$ ms, $n = 3$, $p = 0,558$).

Al examinar los registros obtenidos a partir de células musculares de la cepa mutante que carece de la subunidad LEV-8 se vio que las aperturas de los canales activados por befenio aparecían en episodios largos de activación separados por tiempos de cierre prolongados. Estos episodios, a los que se llamó *clusters*, corresponden a los períodos de activación de una sola molécula que comienza con la transición desde el estado desensibilizado al estado abierto y finaliza volviendo al estado desensibilizado (Salomone et al., 1999) (Figura 21). Este patrón de actividad de los canales fue similar al previamente descrito para ACh (Figura 21), donde se describió que su origen se debe a una mayor desensibilización de los L-AChRs que carecen de LEV-8 (Hernando et al., 2012). Por lo tanto, befenio es capaz, al igual que ACh, de inducir desensibilización de los L-AChRs. En general, los agonistas eficaces de nAChRs muestran capacidad de desensibilizar y producir activación en *cluster* del receptor, mientras que los agonistas muy parciales no generan este tipo de activación. Además, estos resultados demuestran nuevamente que befenio activa los mismos receptores que ACh dado que el comportamiento en *clusters* obtenido con la mutante de LEV-8 se observó en presencia de ambos agonistas.

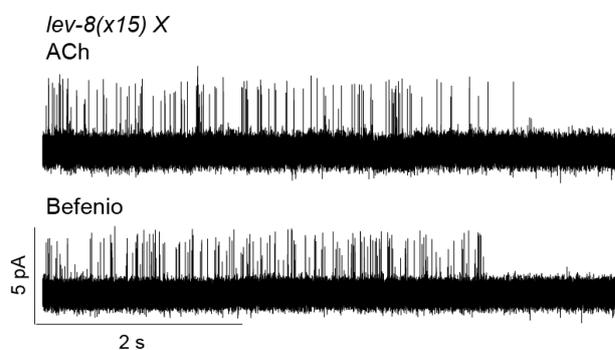


Figura 21: Registros de canal único realizados en células musculares de larvas L1, derivadas de la cepa mutante *lev-8(x15) X* con ACh $50 \mu\text{M}$ y befenio $30 \mu\text{M}$. Potencial de pipeta: 100 mV . Filtro: 9 kHz . La actividad de canal único de los L-AChRs sin LEV-8 disminuyó marcadamente con el tiempo y ocurrió en *clusters* en presencia de ambos agonistas.

Caracterización de befenio como agonista y bloqueador de canal abierto de L-AChRs

Para caracterizar la acción de befenio como agonista de L-AChRs se registraron corrientes de canal único en un rango diverso de concentraciones y se las comparó con aquellas generadas por ACh. La mínima concentración de befenio que permitió la detección de eventos de apertura fue $0,5 \mu\text{M}$. Esta concentración se encuentra en el mismo orden que la de ACh ($0,1 - 0,5 \mu\text{M}$) (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012).

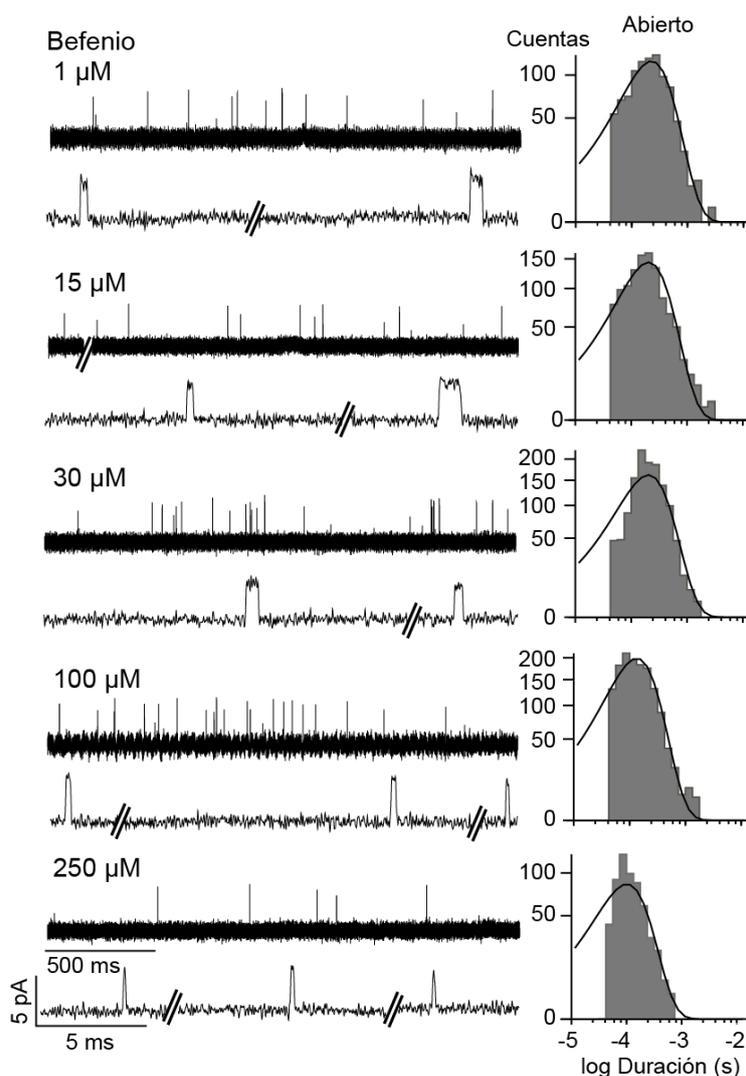
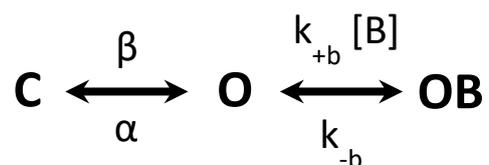


Figura 22: Activación de los L-AChRs en función de la concentración de befenio. Izquierda: registros de L-AChRs en células musculares de nematodos salvajes, cepa PD4251, a diferentes concentraciones de befenio y representados en dos escalas temporales distintas. Las aperturas de los canales se muestran como deflexiones hacia arriba. Filtro: 9 kHz. Potencial de pipeta: 100 mV. Derecha: histogramas representativos del tiempo de estado abierto del canal para cada concentración de befenio.

En el rango de concentraciones testeadas de befenio (0,5 – 250 μM) y a 100 mV potencial de pipeta, la actividad de los canales se evidenció principalmente como eventos de apertura aislados (Figura 22). A 50 μM , la distribución del tiempo de estado abierto mostró un componente principal de $0,21 \pm 0,04$ ms ($n = 6$), similar a los canales activados por ACh 50 μM ($0,25 \pm 0,03$ ms, ($n = 3$)). La duración del tiempo de estado abierto decreció en función de la concentración de befenio. La reducción en la duración del tiempo en estado abierto fue estadísticamente significativa a concentraciones mayores que 100 μM , al igual que lo registrado con ACh (Hernando et al., 2012).

La disminución de la duración del estado abierto del canal en función de la concentración de la droga aplicada es indicativo de un proceso de bloqueo de canal abierto, demostrando que befenio además de ser agonista, también actúa como un bloqueador de canal abierto a concentraciones mayores. Los bloqueadores de canal abierto son NAMs que se unen dentro del canal cuando el receptor se encuentra en estado abierto, se bloquea físicamente el paso de iones y el receptor se inhibe de una manera no competitiva (Bouzat & Mukhtasimova, 2018). Para caracterizar dicho efecto se utilizó un modelo lineal simple de bloqueo (Neher y Steinbach, 1978):



En el esquema, C corresponde a estado cerrado, O al estado abierto y OB al estado bloqueado. β y α son las velocidades de apertura y cierre respectivamente, y k_{+b} y k_{-b} son las velocidades de bloqueo y desbloqueo respectivamente. Se obtuvo una relación lineal entre la inversa del tiempo medio de estado abierto y la concentración de befenio [B]. Mediante un análisis de regresión lineal, se estimó la constante de bloqueo k_{+b} . El valor se obtuvo de la pendiente de la relación: inversa del tiempo de estado abierto del canal (que es una aproximación para α en ausencia de befenio) y la concentración de befenio (B en el esquema) (Figura 23). El valor estimado fue $2,1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, similar al reportado para otros bloqueadores de canal abierto (Neher y Steinbach, 1978; Rayes et al., 2001).

Los histogramas de estado cerrado de los registros en presencia de befenio fueron ajustados con dos o más componentes. El componente principal corresponde al cierre entre aperturas aisladas. La duración fue de $170,77 \pm 66,68 \text{ ms}$ ($n = 3$) para befenio $50 \mu\text{M}$ y $19,25 \pm 8,53 \text{ ms}$ para ACh $50 \mu\text{M}$ ($n = 3$). Es decir que, a la misma concentración de agonista, la probabilidad de encontrar el canal abierto es mayor para ACh que para befenio.

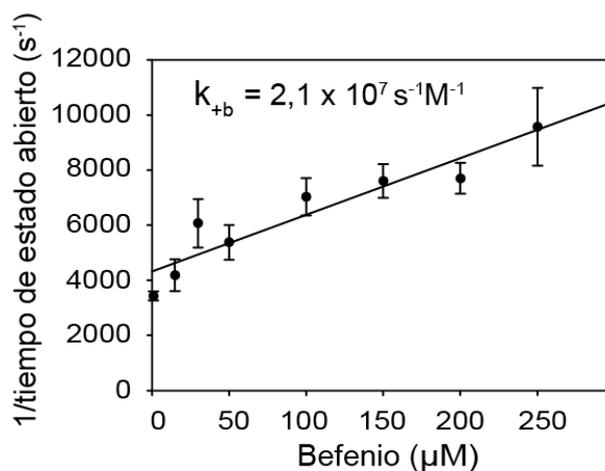


Figura 23: Relación entre la inversa de la duración media de estado abierto (s^{-1}) y la concentración de befenio (μM). Los tiempos de estado abierto fueron obtenidos de los correspondientes histogramas. Los datos fueron ajustados mediante la ecuación $(1/\text{tiempo de estado abierto}) = \alpha + k_{+b} \times [\text{befenio}]$, donde k_{+b} es la velocidad de asociación para befenio en el bloqueo del canal y α es la velocidad aparente de cierre del canal. La pendiente de la curva, ajustada mediante regresión lineal, estima el valor de la constante de bloqueo. Cada punto corresponde a un valor promedio \pm desvío estándar de tres sellos diferentes para cada condición.

El L-AChR es el blanco molecular de befenio en el estadio larval L2 del desarrollo

Con el objeto de evaluar si befenio es capaz de reconocer diferentes blancos moleculares en diversos estadios de desarrollo del nematodo, se utilizó una estrategia de aislamiento celular que permite obtener cultivos de células larvales L2 (Zhang et al., 2011).

A diferencia de las células musculares correspondientes al estadio larval L1 que son pequeñas y tienen forma de huso, las células musculares presentes en los cultivos correspondientes al estadio larval L2 presentaban un cuerpo celular redondo y su tamaño era mayor (Figura 24). Estas características morfológicas típicas coinciden con lo reportado previamente por Zhang et al., 2011. Además, como las células L2 fueron obtenidas de la cepa PD4251 que expresa GFP en músculo, estas podían reconocerse fácilmente mediante microscopía de fluorescencia (Figura 24).

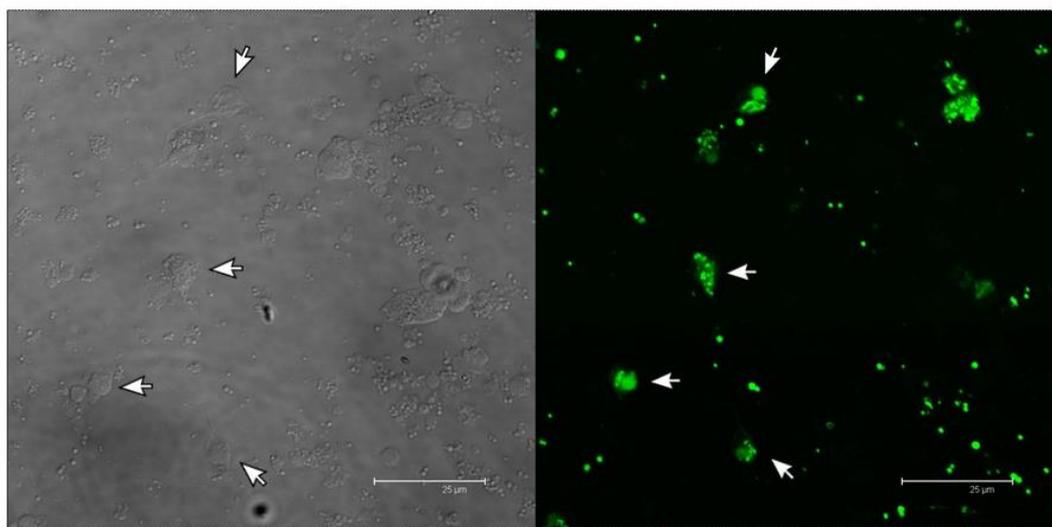


Figura 24: Fotografías de microscopía confocal de cultivos de células musculares de larva L2. Cultivo celular correspondiente a la cepa salvaje PD4251 (*myo-3::GFP*) que expresa GFP nuclear y mitocondrial en todas las células musculares del cuerpo del nematodo. Izquierda: foto por contraste de fases. Derecha: fluorescencia, GFP en verde. Escala 25 µm.

Con el cultivo de células L2 se detectó por primera vez la actividad de canal único generada por ACh y fue comparada con aquella generada por befenio. En general, los patrones de actividad de los canales generados por ambas drogas fueron similares a los registrados en células larvales L1 y no se observó la actividad de otro canal. Estos hallazgos indican que el L-AChR es también el principal blanco molecular de befenio en el estadio larval L2.

	Agonistas	Amplitud (pA)	Tiempo de estado abierto (ms)
L1	ACh 100 µM	3,5 ± 0,2	0,21 ± 0,02
	befenio 50 µM	3,57 ± 0,6	0,21 ± 0,04
L2	ACh 100 µM	3,20 ± 0,1	0,16 ± 0,01
	befenio 50 µM	3,36 ± 0,1	0,18 ± 0,05

Tabla 4: Comparación de las propiedades de los canales activados por ACh y befenio en registros de canal único realizados en células musculares de larvas L1 y L2 de *C. elegans*. Para la obtención de los cultivos celulares se utilizó la cepa PD4251 (*myo-3::GFP*) que expresa GFP en las células musculares del nematodo.

Con ambos agonistas, a un potencial de pipeta de 100 mV, fueron detectadas aperturas de canales con amplitud homogénea: $3,20 \pm 0,12$ pA ($n = 4$) para ACh 100 µM y $3,36 \pm 0,10$ pA ($n = 3$) para befenio 50 µM. El tiempo de estado abierto del canal fue similar, $0,16 \pm 0,01$ ms ($n = 4$) para ACh 100 µM y $0,18 \pm 0,05$ ms ($n = 4$) para befenio 50 µM ($P = 0,63$)(Tabla 4). Los resultados

muestran por primera vez registros de L-AChRs activados por ACh en células larvales L2 y demuestran que en este estadio larval tampoco existe un receptor específico para befenio.

Befenio es un agonista débil y un bloqueador potente del nAChR muscular de mamífero

Con el objetivo de determinar si befenio es selectivo para receptores nicotínicos de nematodos, se realizaron registros de canal único del nAChR muscular de mamífero adulto.

Para ello, se transfectaron células BOSC 23 con el cDNA de las subunidades $\alpha 1$, β , δ y ϵ de ratón para lograr la expresión del nAChR muscular adulto. La activación por ACh de este receptor ha sido ampliamente caracterizada en el Laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular del INIBIBB (Bouzat et al., 2000; Corradi et al., 2007).

Se realizaron registros de canal único sobre las células expresando nAChRs en presencia de befenio como agonista, y dicha actividad fue comparada con la generada en presencia de ACh.

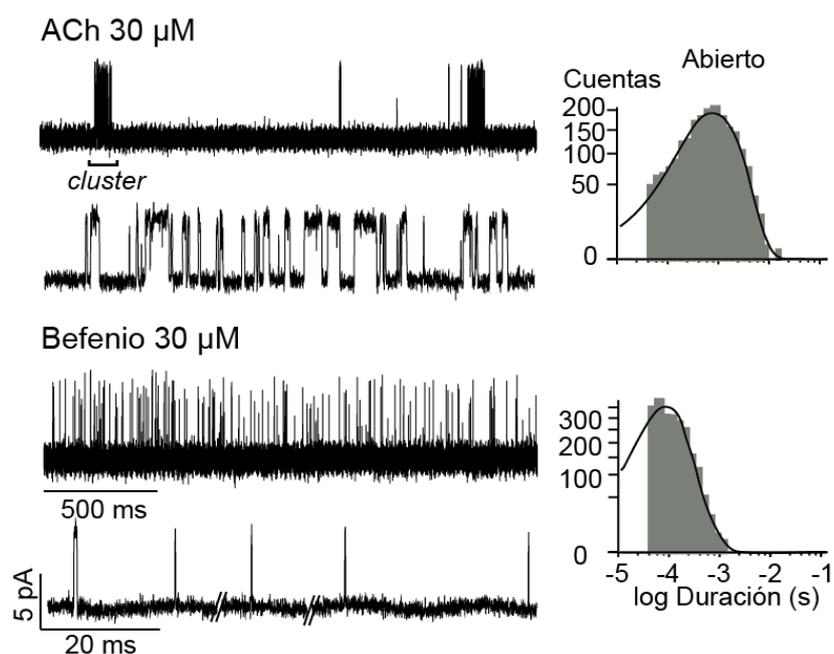


Figura 25: Activación de nAChRs de mamífero por befenio. Registros de canal único realizados en células BOSC 23 transfectadas con los cDNA de subunidades del receptor de mamífero $\alpha 1$, β , δ y ϵ . Izquierda: nAChRs de mamífero activados por ACh o befenio 30 μM a dos escalas de tiempo diferentes. Los canales se muestran como deflexiones hacia arriba. En presencia de ACh, la actividad de los canales en *clusters* fue fácilmente distinguible. No se pudieron distinguir *clusters* en presencia de befenio. Derecha: histogramas del tiempo de estado abierto del canal para cada condición. Potencial de pipeta: 70 mV.

Befenio generó corrientes de canal único a concentraciones tan bajas como $1 \mu\text{M}$; bajo las mismas condiciones se detectaron aperturas con ACh $0,5 \mu\text{M}$. Sin embargo, las aperturas de los canales fueron muy breves en comparación con aquellas activadas por ACh. La distribución del tiempo de estado abierto de los canales activados por befenio $10 \mu\text{M}$ fue ajustada con un componente principal de $0,11 \pm 0,05 \text{ ms}$ ($n = 3$), mientras que la duración del componente principal del estado abierto en presencia de $1 - 100 \mu\text{M}$ de ACh fue de $1,22 \pm 0,32 \text{ ms}$ ($n = 6$ células).

A concentraciones de ACh mayores a $10 \mu\text{M}$, los nAChRs musculares de mamífero se abren en *clusters* o episodios de activación bien definidos (Bouzat et al., 2000; Bouzat y Sine, 2018) (Figura 25). Cada episodio de activación comienza con la transición de un único receptor del estado de desensibilización al estado activado, y termina retornando al estado desensibilizado. A $30 \mu\text{M}$ de ACh las aperturas en *clusters* (duración media del *cluster* $144 \pm 70 \text{ ms}$) mostraron cierres dentro del *cluster* con una duración media de $1,80 \pm 0,29 \text{ ms}$ ($n = 6$).

En cambio, cuando los nAChRs fueron activados por befenio, incluso a concentraciones tan altas como $300 \mu\text{M}$, no se distinguieron *clusters* (Figura 26). Este comportamiento ha sido reportado para agonistas débiles de nAChRs (Akk y Steinbach, 2003).

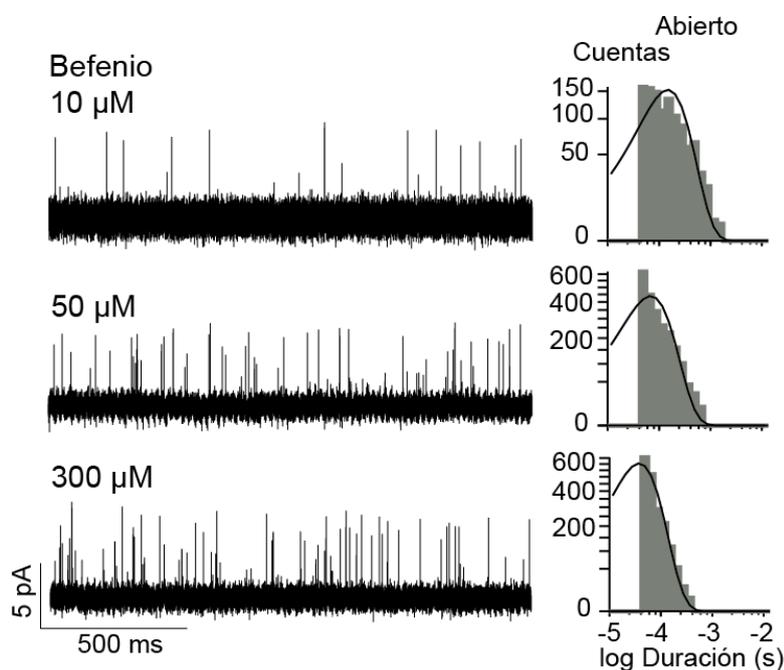


Figura 26: Izquierda: nAChRs de mamífero activados por befenio a diferentes concentraciones. Los canales se muestran como deflexiones hacia arriba. No se distinguen *clusters* en ninguna de las concentraciones testeadas. Derecha: histogramas representativos de tiempo de estado abierto para cada concentración de befenio. Potencial de pipeta: 70 mV .

Estos resultados demostraron que befenio es menos eficaz que ACh para generar aperturas de nAChRs de mamífero. Luego de abrirse, los canales se cierran más rápido que en presencia de ACh, lo cual indica que befenio es un agonista débil del nAChR de mamífero. Además, la disminución en la duración del tiempo de estado abierto del canal en función de la concentración de befenio indicó que dicha droga estaría actuando como un bloqueador de canal abierto del nAChR muscular de mamífero.

El análisis con el esquema lineal simple para describir el bloqueo antes mencionado brindó un valor estimado para la constante de bloqueo (k_{+b} en el esquema) de $7,98 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dicho valor fue cuatro veces mayor que el obtenido para L-AChRs, lo cual indica que la droga es un bloqueador de canal más potente sobre el receptor muscular de mamíferos.

1. Efecto de befenio sobre canales activados por ACh

Para explorar en mayor detalle la acción de befenio en el nAChR muscular de mamífero, se analizó el efecto de la droga sobre el patrón de activación de los nAChRs generado por ACh a potenciales de pipeta tanto positivos como negativos.

A un potencial de pipeta de +70 mV, befenio 30 μM produjo importantes cambios en el patrón de actividad generado por ACh 30 μM . Las aperturas fueron más breves, tal como se muestra en la Figura 27. La duración del componente principal de tiempo de estado abierto se redujo de $\sim 1,19 \pm 0,07$ (ACh 30 μM) a $0,37 \pm 0,01$ ms (ACh 30 μM + befenio 30 μM) ($n = 3$), siendo la diferencia en la duración del canal abierto estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Los *clusters* fueron marcadamente diferentes en presencia de befenio. Con ACh 30 μM la duración del componente principal de estado cerrado fue de 1 - 2 ms, sin embargo, con la combinación de drogas se detectó un componente adicional más lento de $17,9 \pm 4,9$ ms ($n = 3$).

Para determinar si el efecto de befenio en los canales activados por ACh fue resultado únicamente de una competencia por el sitio de unión del ligando o además por bloqueo de canal, se analizaron los cambios a potenciales de pipeta negativos (-70 mV). Dicho estudio se basó en la hipótesis de que el bloqueo de canal abierto en general presenta dependencia de potencial. Es decir, si hubiera un componente de bloqueo importante, el comportamiento de los canales sería muy diferentes a diferentes potenciales de membrana ya que la molécula de befenio presenta carga positiva. En cambio, la competencia por el sitio de unión extracelular del agonista es menos dependiente del voltaje.

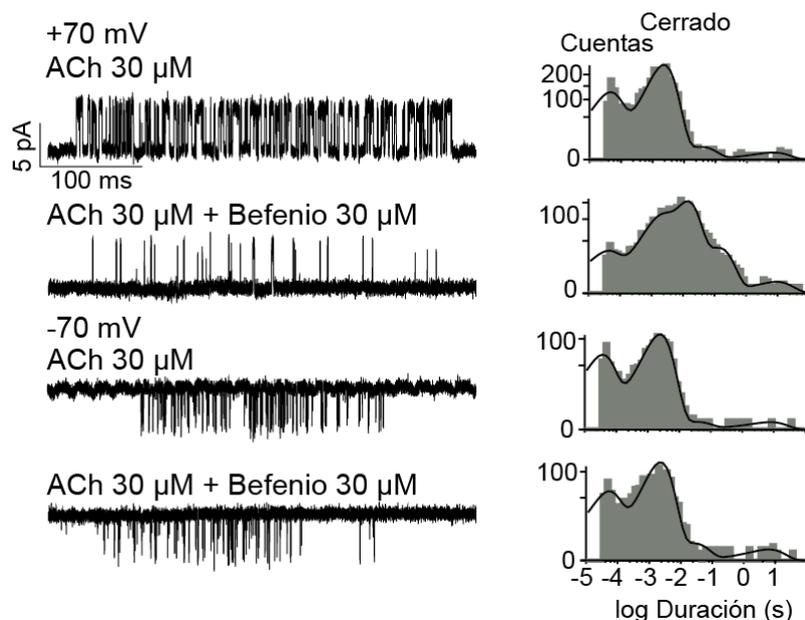


Figura 27: Izquierda: corrientes de canal único en presencia de ACh 30 μ M sola o junto con befenio 30 μ M registradas con un potencial de pipeta de +70 mV (arriba) o -70 mV (abajo). Las aperturas de los canales se muestran como deflexiones hacia arriba a +70 mV y como deflexiones hacia abajo a -70 mV. Derecha: histogramas representativos del tiempo de estado cerrado del canal para cada condición analizada.

A un potencial de pipeta de -70 mV, las aperturas de nAChRs activados por ACh se evidenciaban en *clusters* bien definidos, con un componente de cierre principal de $2,60 \pm 0,64$ ms y un componente de apertura principal de $0,14 \pm 0,04$ ms ($n = 3$). Como muestra la Figura 27, esta actividad no difirió significativamente de la registrada para la combinación ACh 30 μ M y befenio 30 μ M en el mismo potencial de pipeta. En estos registros, los *clusters* fueron claramente distinguidos, y las duraciones de los componentes principales de apertura y cierre fueron de $0,17 \pm 0,02$ y $2,49 \pm 0,19$ ms respectivamente. Se determinó que el incremento en la concentración de befenio a 100 μ M en presencia de ACh 30 μ M no afectó significativamente la duración media del componente principal de cierre a potencial de pipeta negativo ($3 \pm 0,11$ ms) pero se incrementó significativamente a +70 mV (46 ± 11 ms, $n = 3$) en comparación con ACh sola.

Estos resultados indicaron que, en presencia de ACh, befenio actúa principalmente como bloqueador de canal a potenciales de pipeta positivos. Además, la duración del estado cerrado de los canales activados por ACh a potenciales de pipeta negativos, no fue afectada significativamente. Esto indica que el antiparasitario no es capaz de competir con la ACh y que por lo tanto es un agonista de baja afinidad.

2. Registros de corrientes macroscópicas activadas por befenio

Para confirmar si la activación por la droga antihelmíntica es realmente débil, se realizaron registros de corrientes macroscópicas en configuración *whole-cell* utilizando células BOSC 23 transfectadas con el receptor muscular de mamífero. Se aplicaron pulsos de befenio (10 – 1000 μM) durante 1,5 segundos a + 50 y - 50 mV potencial de pipeta. Se encontró que el pico máximo de corriente evocada por befenio era menor al 2 % del generado por concentraciones saturantes de la condición control con ACh (n = 6) y en muchos casos fue indistinguible del ruido de *background*. En conclusión, befenio activa a los nAChRs de mamífero de manera muy poco eficaz.

Estudios *in silico*: befenio se une al sitio de unión de ACh

Para comprender aún más el mecanismo por el cual befenio activa nAChRs a través de la unión al sitio ortostérico y dar una explicación a su selectividad diferencial, se realizaron estudios de *docking* molecular. Estos ensayos fueron realizados por el Dr. Jeremías Corradi. Se utilizaron modelos homólogos al dominio extracelular de dos subunidades adyacentes con el objeto de formar sitios de unión al agonista funcionales. Para ello se tuvieron en cuenta como base dos modelos cristalizados que contienen el *loop* C de la cara principal del sitio de unión en diferente conformación. Se ha reportado que el *loop* C es esencial para desencadenar la activación del canal. Este *loop* pasa de una configuración abierta a una cerrada luego de la unión del agonista, y es este movimiento el que inicia los cambios conformacionales que culminan en la apertura del canal (Billen et al., 2012). Además, se determinó que los agonistas parciales producen un cierre incompleto del *loop* C.

Por este motivo, se utilizó la estructura de $\alpha 4\beta 2$ cristalizada con nicotina que contiene el *loop* C cerrado (PDB 5KXI) y la quimera $\alpha 7/\text{AChBP}$ cristalizada con el agonista parcial lobelina que contiene el *loop* C parcialmente cerrado (PDB 5AFM).

La disposición de las cinco subunidades del L-AChR en el pentámero, como así también el número de sitios de unión funcionales permanece incierto. Por ello se modelaron 10 posibles interfaces entre subunidades para el L-AChR de *C. elegans*: UNC-63/UNC-29, UNC-38/UNC-29, LEV-8/LEV-1, LEV-8/UNC-63, LEV-8/UNC-38, LEV-8/UNC-29, UNC-63/UNC-38, UNC-38/UNC-63, UNC-63/LEV-1 y UNC-38/LEV-1 (los últimos cuatro solo para el modelo con el *loop* C parcialmente cerrado), y las dos interfaces con subunidades del receptor muscular de mamífero que comprenden el sitio de unión al agonista ($\alpha 1/\delta$ y $\alpha 1/\epsilon$). Para ACh, las conformaciones consideradas favorables fueron aquellas que mostraron las interacciones catión- π previamente

descriptas entre los grupos amino del ligando y los residuos aromáticos del bolsillo de unión (W55, Y93, W149, Y190, Y198, numeración correspondiente a la subunidad $\alpha 1$) (Dougherty, 2007).

Con el modelo PDB 5KXI, que tiene el *loop* C cerrado, en todas las interfaces testeadas de mamífero y nematodo, el *docking* de ACh reveló que el modelo energéticamente más favorable fue el que mostró a la molécula orientada con su amina cuaternaria hacia el lado de la membrana o parte inferior de la hendidura, como carbamilcolina en AChBP (Celie et al., 2004). Los grupos cargados positivamente mostraron potencial para formar las típicas interacciones catión- π con el grupo indol de W149 en el *loop* B. ACh fue capaz también de formar enlaces hidrógeno con diferentes residuos de la cara complementaria. En todas las interfaces testeadas, la frecuencia de conformaciones favorables fue mayor al 40 % (de 40 a 100 %) y la BBE para ACh fue similar entre todas las interfaces testeadas (-4,3 a -5,1 kcal/mol; Celie et al., 2004).

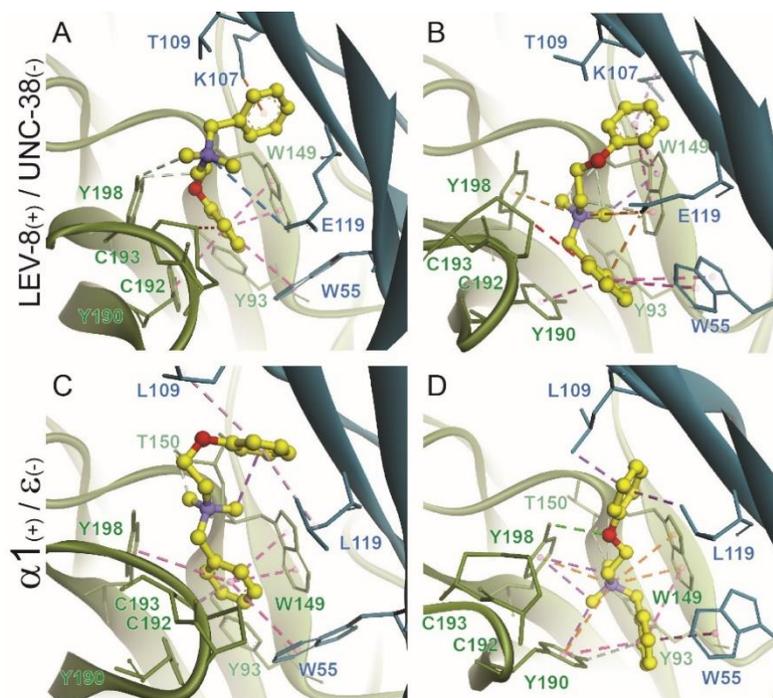


Figura 28: Docking molecular de befenio entre dos interfaces que forman el sitio ortostérico. Se crearon modelos por homología del dominio extracelular de dos subunidades adyacentes usando la estructura de PDB 5KXI (A y C, *loop* C cerrado) y PDB 5AFM (B y D, *loop* C parcialmente cerrado). A y B corresponden a la interface LEV-8/UNC-38, y C y D a la interface $\alpha 1/\epsilon$. Los *loops* de la cara principal se muestran en verde y los de la cara complementaria en azul. Befenio está representado en amarillo. Interacciones catión- π en naranja, π - π en rosa, uniones hidrógeno en celeste, π -azufre en rojo y π -alquilo en violeta.

Befenio también se unió dentro de todas las interfaces lo cual sugiere que puede activar nAChRs a través de la unión al sitio de unión ortostérico del agonista, pero hubo importantes diferencias con respecto al *docking* de ACh. Si bien befenio tiene un grupo amonio cuaternario, fue incapaz de realizar las típicas interacciones catión- π con W149 o con otros grupos aromáticos en la cavidad de todas las interfaces testeadas (Figura 28 A y C). Otra diferencia con ACh fue la elevada heterogeneidad de conformaciones, lo cual sugiere que podría adoptar diferentes conformaciones en el sitio de unión al agonista como fue reportado para algunos agonistas parciales (Hibbs et al., 2009). En lugar de interacciones catión- π , befenio presentó interacciones π - π entre uno de sus grupos aromáticos y grupos aromáticos de los residuos Y93, W149, Y190, Y198 y W55 (Figura 28 A y C). También fue capaz de formar uniones hidrógeno y otro tipo de uniones, como π -alquilo, con residuos de la cara complementaria. Otra interacción interesante fue π -azufre con las cisteínas conservadas C192 y C193. La BBE fue más negativa para befenio que para ACh en todas las interfaces, desde -6,7 en LEV-8/UNC-63 a -8,7 kcal/mol en $\alpha 1/\delta$. La comparación entre las interfaces de mamífero y de nematodo no mostró diferencias importantes en las orientaciones de befenio en el sitio de unión (Figura 28 A y C).

Como los agonistas parciales producen contracciones parciales del *loop* C en el sitio de unión (Billen et al., 2012), se exploraron modelos homólogos en esta conformación (Figura 28 B y D). Befenio se unió dentro del sitio de unión en todas las interfaces. Todas las conformaciones mostraron BBE similares a las de los modelos 5KXI (-6 a -8 kcal/mol). En estos modelos con el *loop* C parcialmente cerrado, befenio mostró la capacidad de realizar las típicas interacciones catión- π con W149 y/o Y198 (Figura 28 B y D). La frecuencia de conformaciones con interacciones catión- π en todas las interfaces de nematodos fue menor al 10 %, excepto para la interface LEV-8/UNC-38. Llamativamente, en esta interface LEV-8/UNC-38, el 80 % de las conformaciones mostró interacciones catión- π , indicando que éste podría ser un sitio activable para befenio. Para el nAChR muscular, la interacción catión- π típica fue observada en la interface $\alpha 1/\epsilon$ (frecuencia del 18 % aproximadamente) pero no en la interface $\alpha 1/\delta$. Estos resultados sugieren que solo uno de los dos sitios podría ser activado por befenio, y esto, junto con la baja frecuencia de unión al sitio $\alpha 1/\epsilon$, podría explicar el comportamiento como agonista parcial.

Discusión

Las parasitosis generadas por nematodos se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo. En Argentina, estudios descriptivos han informado prevalencias de parasitosis por encima del 80 % en algunas localidades del norte y sur del país, mientras que en la zona central se registran porcentajes cercanos al 45 % (Juárez y Rajal, 2013).

Estos organismos causan desnutrición, anemia y otras enfermedades que ponen en peligro el crecimiento y desarrollo de los niños, además de generar un bajo rendimiento y ausentismo escolar (OPS/OMS). En ciertos casos, las parasitosis ocasionadas por nematodos parásitos intestinales como *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*, llevan a la muerte de los pacientes debido a obstrucción intestinal y de conductos biliares. Estos nematodos parásitos, también pueden empeorar el estado de salud de personas con otras enfermedades como malaria, tuberculosis y SIDA (Trailović et al., 2015).

Caenorhabditis elegans ha emergido como un modelo de nematodo parásito (Jones et al., 2005). En la unión neuromuscular cuenta con tres receptores *Cys-loop*: el receptor de ácido γ -aminobutírico (GABAR), el receptor nicotínico sensible a levamisol (L-AChR) y el receptor nicotínico insensible a levamisol (N-AChR) (Ballivet et al., 1996). Si bien los receptores nicotínicos del nematodo presentan diferente composición de subunidades y propiedades cinéticas, ambos contribuyen, en diferente grado, a la locomoción del organismo (Touroutine et al., 2005).

Los nAChRs son una familia de canales pentaméricos muy conservada que media la neurotransmisión tanto de vertebrados como de invertebrados. Estos receptores están implicados en la memoria, nocicepción, adicciones a nicotina, como así también a desórdenes neuronales como Parkinson y epilepsia (Touroutine et al., 2005). En nematodos, los nAChRs musculares median la contracción de músculos del cuerpo durante la locomoción y son importantes blancos de drogas antihelmínticas (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012).

Los nAChRs de *C. elegans* han sido clasificados farmacológicamente en receptores sensibles a nicotina (N-AChRs) y a levamisol (L-AChRs). En nematodos parásitos se ha descrito una mayor diversidad farmacológica y funcional de AChRs (Blanchard et al., 2018), sin embargo, existen marcadas diferencias entre especies de nematodos parásitos y las bases moleculares no están claras. Por ejemplo, para *Oesophagostomum dentatum* (clado V) se han descrito cuatro subtipos de canales en función de su conductancia. En *B. malayi* (clado III) se reportaron cuatro subtipos diferentes de receptores: L, P, M y N activados preferentemente por levamisol, pirantel, morantel y nicotina, respectivamente. Por su parte, *Ascaris suum* (clado III), el parásito

gastrointestinal de cerdos, cuenta con un subtipo N sensible a nicotina, uno L sensible a levamisol y uno B sensible a befenio (Levandoski et al., 2005; Verma et al., 2017).

A pesar de que existen ciertas diferencias en la composición de subunidades y en la farmacología de los nAChRs musculares tanto entre parásitos, como así también entre parásitos y *C. elegans*, el nematodo de vida libre proporciona una excelente herramienta para descifrar la composición de subunidades del L-AChR en parásitos y se ha convertido en un importante organismo modelo en el estudio de drogas antiparasitarias y sus blancos moleculares (Brown et al., 2006; Neveu et al., 2010). La caracterización molecular de nAChRs de *C. elegans* es útil para destacar similitudes con nAChRs de parásitos y para proveer de información con el fin de recapitular nAChRs de parásitos en *C. elegans* (Blanchard et al., 2018).

Dado que es posible realizar estudios electrofisiológicos en las uniones neuromusculares de *C. elegans* (Richmond y Jorgensen, 1999), mediante registros de canal único realizados en células musculares de larvas L1 de *C. elegans* se vio que ACh activa los L-AChRs. Por lo tanto, se cree que durante la transmisión neuromuscular de *C. elegans* la mayor parte de la corriente generada por ACh fluye a través de los L-AChRs. Si bien se determinó que el RNAm de la subunidad ACR-16 estaba presente en las células musculares de larvas L1, no se detectó actividad de los N-AChRs. Esto podría deberse a que la conductancia del receptor es muy baja, a que el receptor se desensibiliza muy rápido, a que la eficacia de activación es baja o a que el subtipo L-AChR predomina en el estadio larval L1 (Rayes et al., 2007). Utilizando células musculares del mutante nulo en la subunidad UNC-29 (esencial para el L-AChR) se obtuvieron corrientes macroscópicas activadas por ACh que corresponderían al N-AChR. Las corrientes se detectaron en el 25 % de las células selladas, el pico de las mismas fue pequeño y la velocidad de desensibilización muy elevada (Hernando et al., 2012). Por lo tanto, la contribución relativa del N-AChRs a la corriente generada por ACh sería mayor que la de L-AChRs en células musculares de nematodos adultos (Touroutine et al., 2005; Almedom et al., 2009).

El análisis de las propiedades de canal único de L-AChRs de *C. elegans* mutantes nulos indicó que cinco subunidades diferentes, tres de ellas tipo α : UNC-38, UNC-63 y LEV-8, y dos no α : LEV-1 y UNC-29, se ensamblan y dan lugar a un L-AChR funcional (Fleming et al., 1997; Culetto et al., 2004; Towers et al., 2005; Almedom et al., 2009; Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012). La ausencia de las subunidades no esenciales LEV-1 o LEV-8 genera L-AChRs funcionales, pero las propiedades de los canales difieren (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012). En el músculo de nematodos salvajes, el ensamblaje de las cinco subunidades parecería estar restringido, sin embargo, en ausencia de las subunidades no esenciales podrían ocurrir arreglos pentaméricos

diferentes. Tanto la subunidad accesoria LEV-1 como LEV-8, pueden ser reemplazadas por otras subunidades en su ausencia.

En *A. Suum*, el ensamblaje parecería no ser demasiado estricto ya que las subunidades ortólogas, UNC-29 y UNC-38, pueden combinarse dentro del pentámero en diferentes estequiometrias, generando un amplio espectro de clases farmacológicas diversas: Subtipo L (1:5 Asu-unc-38:Asu-unc-29), en el cual levamisol actúa como agonista completo, nicotina como agonista parcial, y además responde a pirantel pero no a oxantel; subtipo N (5:1 Asu-unc-38:Asu-unc-29), en el cual nicotina actúa como agonista completo, levamisol como agonista parcial, y además responde a oxantel pero no a pirantel (Williamson et al., 2009). Además, este parásito cuenta con un receptor subtipo B sensible a befenio, cuya estequiometría podría ser (Asu-UNC-38)₂(Asu-UNC-29)₂(Asu-UNC-63)₁ aunque aún no existe evidencia directa (Martin et al., 1996; Robertson et al., 2002; Williamson et al., 2009).

La sensibilidad a befenio ha sido atribuida a la subunidad Asu-UNC-63 en *A. suum* (Williamson et al., 2009). En *H. contortus*, un parásito que pertenece al mismo grupo filogenético que *C. elegans* (Clado V), befenio activa selectivamente el subtipo de receptor compuesto por las subunidades UNC-29.1, UNC-38, UNC-63 y ACR-8, mientras que el subtipo que carece de la subunidad ACR-8 es insensible a dicha droga, por lo tanto, se postuló que el sitio de unión de befenio involucra a la subunidad ACR-8 (Charvet et al., 2012).

Tanto la presencia o no de un receptor nicotínico subtipo B en *C. elegans*, como la acción molecular del antihelmíntico colinérgico befenio en el nematodo de vida libre no habían sido exploradas.

Utilizando a *C. elegans* en esta Tesis se demostró que nematodos mutantes nulos para la subunidad UNC-38, esencial para el receptor nicotínico sensible a levamisol, son resistentes al efecto paralizante de befenio. Además, el antihelmíntico no activa canales en células musculares L1 aisladas de dicha cepa mutante, indicando que el L-AChR es el blanco molecular de befenio.

Resultados similares se obtuvieron en el parásito *A. suum*, donde befenio actúa como un activador potente de los mismos canales activados por levamisol indicando que ambas drogas pueden actuar sobre los mismos subtipos de AChRs (Qian et al., 2006). Se reportó también, en *H. contortus*, que befenio activa el Hco-L-AChR1 sensible a levamisol, y que el valor de EC₅₀ para esta droga es similar al valor de ACh y levamisol, indicando que Hco-L-AChR1 tiene afinidad similar por los tres agonistas (Charvet et al., 2012). En *B. malayi*, el L-AChR es sensible a levamisol y befenio (Verma et al., 2017).

Es decir, los resultados obtenidos en este Capítulo de la Tesis son extrapolables a varias especies parasíticas, mientras que para otras aún falta conocer en detalle las bases moleculares de las diferencias en la sensibilidad a befenio y levamisol.

Como muchos eventos del desarrollo post-embrionario y los mecanismos moleculares que los controlan no pueden ser estudiados usando cultivos de células embrionarias (Zhang et al., 2011), se procedió a obtener cultivos de células de larvas L2. Analizando registros de canal único del L-AChR generados por ACh en células musculares del estadio L2, se determinó que dicha actividad es similar a la de los registros realizados en células musculares de L1, y se demostró que el L-AChR sería también el blanco molecular de befenio en ese estadio de desarrollo.

En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que no existe un receptor específico para befenio en *C. elegans* sino que este compuesto ejerce su acción antihelmíntica actuando como agonista del L-AChR, al igual que se reportó para levamisol y pirantel.

Se mostró que befenio y levamisol, un agonista potente del L-AChR, tienen efecto paralizante aditivo y que la combinación de las drogas es de gran eficacia. Por lo tanto, en este Capítulo se propone que dicha combinación podría ser una estrategia útil para combatir la adquisición de resistencia en nematodos parásitos.

En nematodos parásitos la resistencia al antihelmíntico colinérgico levamisol ha sido estudiada. Se sabe que, en parásitos, la fosforilación del receptor regula la sensibilidad a levamisol, lo cual sugiere que pueden existir diferentes subtipos funcionales de canales como resultado de modificaciones postraduccionales en el receptor (Trailović et al., 2002; Trailović et al., 2015). Además, en *H. contortus* se vio que la presencia de la subunidad Hco-UNC-63 del L-AChR truncada sería un mecanismo asociado a la resistencia a levamisol (Boulin et al., 2011).

Al disminuir la sensibilidad a levamisol en nematodos parásitos, la presencia de un subtipo de receptor B sensible preferencialmente a befenio en nematodos parásitos, además del subtipo L sensible a levamisol, hace que la combinación de estas drogas sea una excelente alternativa para sobrellevar la resistencia (Qian et al., 2006; Robertson y Martin, 2007). Por otro lado, en función de los resultados de este Capítulo, y como se ha reportado que befenio actúa sobre el subtipo L-AChR en varios nematodos parásitos, la combinación de befenio y levamisol podría ser beneficiosa aun para aquellos parásitos que carecen de un subtipo B-AChR. Como se demostró en *C. elegans*, ambas drogas actuarían sobre el L-AChR potenciando sus efectos.

Se demostró que befenio es capaz de activar los L-AChRs a bajas concentraciones. El patrón de actividad de los canales, como así también la duración del estado abierto a concentraciones por debajo de aquellas que bloquean, son idénticos a los determinados en presencia de ACh. La única diferencia entre la actividad de los L-AChRs activados por ACh y befenio fue la mayor duración media del componente principal de estado cerrado en presencia de la droga antihelmíntica, indicado una menor probabilidad de estado abierto para befenio respecto a ACh. En cambio, se observaron marcadas diferencias en la actividad de befenio y ACh sobre el nAChR muscular de mamífero.

En sistemas de expresión heteróloga de receptores, los tiempos de estado cerrado entre *clusters* o entre aperturas aisladas donde no se detectan *clusters*, no brindan información relevante. Esto se debe a que se desconoce el número de receptores presentes en el parche y además a que el nivel de expresión puede variar entre células, lo cual hace que la duración de los tiempos de cierre sea variable y no se relacione directamente con la cinética del receptor (Bouzat y Mukhtasimova, 2018; Bouzat y Sine, 2018). Sin embargo, en los cultivos primarios de células L1 de *C. elegans*, la duración del componente principal del estado cerrado en registros de L-AChRs activados por ACh es relativamente constante en todos los parches y es dependiente de la concentración de agonista (Raves et al., 2007). Por este motivo, es posible sugerir que la prolongación de la duración del estado cerrado en presencia de befenio con respecto a iguales concentraciones de ACh podría deberse a una menor eficacia ocasionada por su acción como agonista y/o a un bloqueo lento del canal.

ACR-8 es una subunidad tipo α con alta homología a LEV-8 (Mongan et al., 1998). En *C. elegans* está presente en músculo, pero su función es desconocida (Gottschalk et al., 2005; Touroutine et al., 2005; Brown et al., 2006). En corrientes macroscópicas se vio que mutantes con delección *acr-8(ok1240)*, responden tanto ACh como a levamisol, lo cual indica que es poco probable que la subunidad ACR-8 integre los receptores de ACh presentes en el músculo del cuerpo (Touroutine et al., 2005). En concordancia con este trabajo, registros de canal único realizados en células L1 obtenidas a partir de cepas mutantes nulas en diferentes subunidades nicotínicas, demostraron que ACR-8 no es esencial para el L-AChR ya que existía actividad de los canales en cada cepa mutante nula estudiada. Además, se vio que ACR-8 podría reemplazar a LEV-8 en su ausencia (Hernando et al., 2012), ya que la actividad de canales registrados en células aisladas del doble mutantes ACR-8/LEV-8 presentaba importantes diferencias con respecto a los registros realizados con mutantes en cada subunidad por separado.

Se propuso que la subunidad ACR-8 es requerida para la acción de befenio en *H. contortus* (Charvet et al., 2012), que dicha subunidad tiene un rol esencial en la sensibilidad a levamisol en nematodos parásitos (Boulin et al., 2011; Blanchard et al., 2018) y que befenio tendría el mismo sitio de unión que levamisol involucrando la subunidad Hco-ACR-8 (Charvet et al., 2012).

En los genomas de nematodos parásitos, ortólogos de *acr-8* están ampliamente distribuidos, en contraste, ortólogos de *lev-8*, están solo presentes en un grupo reducido de especies parasíticas (Blanchard et al., 2018). La subunidad LEV-8 no ha sido detectada en parásitos *Trichostrongylid* y ACR-8 es un candidato para reemplazarla en L-AChRs (Fauvin et al., 2010; Neveu et al., 2010). Como este receptor es el blanco de levamisol, ACR-8 podría estar involucrada en los mecanismos moleculares que generan la adquisición de resistencia a levamisol. De esta forma, cepas de *C. elegans* que contienen subunidades ACR-8 de parásitos podrían ser modelos útiles para explorar la cinética de los canales activados por befenio (Blanchard et al., 2018). Sin embargo, de manera más sencilla, los mutantes nulos de *lev-8* podrían ser buenos modelos para el estudio de drogas antihelmínticas (Hernando et al., 2012).

Por ello se exploró la acción de befenio y levamisol en mutantes de *C. elegans* que carecen de LEV-8, subunidad que tendría como función mantener bajas las tasas de desensibilización extendida de L-AChRs y que podría ser reemplazada por ACR-8 en dicho receptor (Hernando et al., 2012; Blanchard et al., 2018).

Se encontró que el L-AChR mutante de LEV-8, que tendría ACR-8 en su reemplazo, también es activado por befenio. Ante la presencia de esta droga antihelmíntica, la actividad de canal único del receptor sin LEV-8 decrece marcadamente en función del tiempo y ocurre en *clusters*, lo mismo que se registró para levamisol y ACh (Hernando et al., 2012). Dicho efecto se postuló que se debe a un aumento en la velocidad de desensibilización del L-AChR que carece de la subunidad LEV-8 con respecto al receptor nativo. En este Capítulo, se demostró que befenio también es capaz de inducir desensibilización en el mutante dado que origina activación de los canales en *clusters*. El aumento de la desensibilización podría actuar como mecanismo de protección contra drogas que activan receptores y generan parálisis, y esto explicaría la resistencia parcial a befenio en la cepa que carece de LEV-8.

Se puede concluir en que ambas subunidades, LEV-8 y ACR-8, podrían mediar la respuesta a befenio en *C. elegans*, tal como se vio en los registros de canal único donde tanto el receptor nativo como aquel conformado por la subunidad ACR-8 eran activados por befenio. Más aún, los ensayos de comportamiento mostraron que el receptor nativo, con la subunidad

LEV-8, sería más sensible a befenio que el receptor con ACR-8. Esto último se refuerza con los estudios de *docking* molecular que indican que la interface UNC-38/ LEV-8 podría ser un sitio de activación del receptor por befenio.

Se busca a futuro lograr drogas antiparasitarias de alta selectividad, para evitar un impacto negativo en el hospedador. La clave en la efectividad y uso seguro de drogas antihelmínticas es la toxicidad selectiva entre los nAChRs de nematodos parásitos y los presentes en la placa motora de mamíferos (hospedador) (Trailović et al., 2015). Para ello es necesario explorar si los ortólogos entre hospedador y parásito difieren considerablemente en sus propiedades funcionales y farmacológicas. Por este motivo, se estudió la acción de befenio sobre nAChRs de mamífero.

Los nAChRs de vertebrados se dividen en dos grupos: el nAChR del músculo esquelético compuesto por las subunidades 2α , 1β , 1ϵ y 1δ , en adultos y nAChRs neuronales que presentan estequiometrías más variables (Robertson y Martin, 2007).

En este Capítulo se demostró que befenio activa el nAChR muscular de mamífero, actuando como un agonista débil. Las principales características que revelan esta actividad son, por un lado, la ausencia de *clusters* en un determinado rango de concentraciones, lo cual difiere al patrón de activación generado por ACh u otros agonistas totales (Akk y Steinbach, 2003; Bouzat y Mukhtasimova, 2018; Bouzat y Sine, 2018), y por otro lado, la marcada reducción en la duración del tiempo en estado abierto con respecto a canales activados por ACh. También se demostró que befenio es un potente bloqueador de canal comportándose como un inhibidor del nAChR.

La ventaja del uso de registros de canal único es que si la actividad de befenio sobre nAChRs hubiese sido solo testada a nivel macroscópico su actividad como agonista parcial no hubiese sido detectada dada la menor sensibilidad de los registros en configuración *whole-cell*. Resultados similares fueron obtenidos con levamisol (Rayes et al., 2004). Si bien el pico de corriente inducido por la droga fue el 3 % del activado por su agonista, mediante registros de canal único se demostró que esta droga es capaz de activar el nAChR de mamífero, que las aperturas son más breves en comparación con ACh, que no aparecen en *clusters* y que el antihelmíntico produce bloqueo de canal abierto.

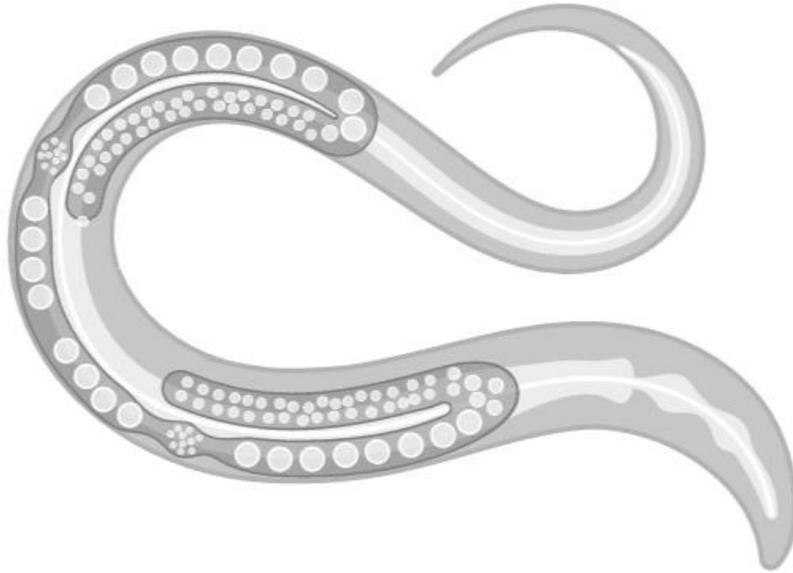
La aplicación combinada de ACh y befenio reveló que la principal acción de la droga antihelmíntica sobre el nAChR muscular de mamífero es la de actuar como un inhibidor mediante el bloqueo del canal dependiente de voltaje. Además, actúa como un agonista de baja

afinidad que no afecta la activación de ACh a potenciales de pipeta negativos, en los cuales el bloqueo de canal se reduce.

Los estudios de *docking* molecular realizados en ese Capítulo han proporcionado ideas sobre la activación de nAChRs al unirse befenio al sitio ortostérico. Los sitios de unión del ligando están localizados entre interfaces de subunidades. Las subunidades α proveen la cara principal de cada sitio del agonista. Dicha cara está formada por los *loops* A-C, conformando una cavidad con residuos aromáticos (Y190, W149, Y198, Y93) que estabilizan el amonio del agonista mediante interacciones catión- π y/o uniones de hidrógeno (Xiu et al., 2009). El *loop* C se cierra para cubrir al agonista, un evento asociado con la activación y la apertura del canal (Mukhtasimova et al., 2009; Unwin y Fujiyoshi, 2012). El *loop* C adopta una conformación abierta en ausencia de agonistas o en presencia de antagonistas (Miller y Smart, 2010; Billen et al., 2012). La estructura, obtenida mediante rayos X, de AChBP junto con agonistas parciales muestra una incompleta contracción del *loop* C (Hibbs et al., 2009; Billen et al., 2012; Spurny et al., 2015). Por ello se generaron interfaces de sitios de unión sobre la base de dos modelos estructurales, uno con el *loop* C cerrado y otro con una conformación parcialmente cerrada del *loop* C (como en presencia de agonistas parciales). En ambos modelos, befenio interaccionó dentro del sitio de unión en todas las interfaces, indicando que puede actuar como un agonista ortostérico. Para el modelo con el *loop* C cerrado las principales características de la unión del befenio fueron: 1) ausencia de interacciones catión- π con W149 en el *loop* B que ha sido reportada para la mayoría de los agonistas de nAChRs (Billen et al., 2012; Post et al., 2017), 2) potencial para realizar interacciones π - π entre uno de sus grupos aromáticos y los grupos aromáticos de residuos tirosina y triptófano, y 3) potencial para realizar interacciones π -sulfuro con cisteínas conservadas del *loop* C de la cara principal. Los resultados sugieren nuevos modos de unión y explican la menor eficacia generada por la falta de interacciones catión- π . Alternativamente, befenio podría causar una contracción incompleta del *loop* C, lo cual fue evaluado en el segundo modelo. En éste, befenio mostró potencial para formar las típicas interacciones catión- π con W149 y/o Y198. El requisito de un *loop* C parcialmente cerrado para permitir las interacciones claves del sitio de unión podría explicar el agonismo parcial de la droga. Aunque casi todas las interfaces del nematodo mostraron la capacidad de formar interacciones catión- π , la frecuencia fue marcadamente mayor en la interface LEV-8/UNC-38. Esta frecuencia elevada y la posibilidad de múltiples interacciones con sitios de unión podría explicar la mayor eficacia de befenio para activar L-AChRs comparado con nAChRs de mamífero. Desafortunadamente, la disposición de las subunidades en el arreglo pentámero de L-AChR permanece desconocida y, por ello, no es posible asegurar las interfases presentes en el receptor

nativo. Resultó interesante que la interface $\alpha 1/\delta$ no mostro interacciones catión- π . Por lo tanto, la baja acción de befenio en nAChRs de mamífero podría ser explicado por la activación de un solo sitio de unión ortostérico del receptor (interface $\alpha 1/\epsilon$).

Este estudio proporcionó nuevos conocimientos sobre las bases moleculares de acción farmacológica antihelmíntica, que fortalecen el camino para el desarrollo de nuevas drogas.



CAPÍTULO II

RECEPTORES *CYS-LOOP* MUSCULARES DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO BLANCOS MOLECULARES DE TERPENOIDES CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA.

CAPÍTULO II: RECEPTORES CYS-LOOP MUSCULARES DE CAENORHABDITIS ELEGANS COMO BLANCOS MOLECULARES DE TERPENOIDES CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA.

Introducción

Debido a la ausencia de vacunas efectivas para tratar parasitosis ocasionadas por nematodos, son necesarios antihelmínticos capaces de combatir esta problemática de salud pública (Robertson et al., 2015; Verma et al., 2017). El tratamiento con drogas antihelmínticas continúa siendo una herramienta esencial, sin embargo, dada la presencia de resistencia en especies parasíticas, es necesario el desarrollo de nuevos agentes nobles y efectivos. Ante este panorama, las sustancias químicas generadas por las plantas emergen como potenciales compuestos antihelmínticos.

Muchas plantas han sido ampliamente utilizadas para el cuidado de la salud ya que poseen actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, espasmolíticas, sedativas, analgésicas y anestésicas locales. Estas propiedades son atribuidas a fitoconstituyentes como glicósidos, saponinas, flavonoides, esteroides, taninos, alcaloides y terpenos. La presencia de compuestos químicos ha convertido a las especies vegetales en una fuente esencial para el descubrimiento de nuevas moléculas utilizadas para tratar diversas enfermedades (Batiha et al., 2020). Un ejemplo interesante son las hojas de sauce, que eran utilizadas por sus propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias (Wick, 2012). El componente activo de la corteza de sauce, la salicina, termino siendo el precursor de la aspirina, uno de los fármacos más utilizados a nivel mundial.

Las plantas medicinales son una fuente alternativa y atractiva de compuestos antihelmínticos botánicos. Producen aceites esenciales como productos orgánicos del metabolismo secundario (Trailović et al., 2015). Dichos aceites son una mezcla compleja de diferentes compuestos, principalmente caracterizadas por terpenos y terpenoides, biomoléculas de gran interés farmacéutico y biotecnológico, incluidas aquellas con actividad antihelmíntica (Ferreira et al., 2016). Timol, carvacrol y eugenol son compuestos fenólicos monocíclicos, presentes en aceites esenciales de plantas aromáticas como el tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*) y clavo (*Syzygium aromaticum*).

Thymus vulgaris es un arbusto perteneciente a la Familia *Lamiaceae*, que se cultiva en diferentes partes del mundo. Ha sido muy utilizado en comidas y productos cosméticos debido a sus importantes características aromáticas. Mediante análisis fitoquímicos se identificaron

diferentes compuestos presentes en la planta, como por ejemplo flavonoides, taninos, saponinas y compuestos fenólicos, y su aceite esencial es rico en el monoterpeno timol y su isómero carvacrol (Ferreira et al., 2016).

Origanum vulgare es una hierba perenne que pertenece a la Familia *Lamiaceae*. Es una fuente valiosa de metabolitos secundarios naturales y de aceites esenciales de gran importancia en medicina, farmacéuticas, alimentación e industria cosmética. Su aceite esencial es una mezcla de diferentes compuestos, y su mayor constituyente son los terpenos (mono- y sesquiterpenos). El sabor del aceite de orégano se debe a la presencia de timol y carvacrol, siendo este último el componente principal del aceite esencial (Moghrovyan et al., 2019).

Syzygium aromaticum, conocido como clavo, es un capullo seco perteneciente a la Familia *Myrtaceae*. Se usa comercialmente con fines medicinales y en la industria de perfumes. Además, el clavo puede ser utilizado para preservar algunos alimentos, especialmente la carne debido a su potente actividad antimicrobiana y antioxidante. El aceite esencial de esta especie es usado para el tratamiento de quemaduras y heridas, y como analgésico para la salud dental. Está compuesto por moléculas fenólicas como ácido hidroxibenzoico, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y eugenol, su principal molécula bioactiva, y derivados de ácido gálico como por ejemplo taninos hidrolizables (Batiha et al., 2020).

Los fenoles o compuestos fenólicos están muy presentes en la naturaleza componiendo diferentes productos naturales. Incluyen: monofenoles o terpenoides (timol y carvacrol), dioles de benceno (catecoles y resorcinoles), flavonoides (quercetina), ácido benzoico substituido (ácidos gálicos y ácidos vanílicos) y ácido cinámico (Bustos et al., 2019).

La actividad biológica reportada para extractos de productos naturales es consecuencia generalmente del carácter antioxidante intrínseco de los compuestos fenólicos. Esta propiedad se origina por la habilidad del grupo fenol de formar un radical fenoxi al donar un átomo de hidrógeno. Los aniones fenoxi pueden eliminar radicales libres y participar en reacciones de quelación de metales. El tipo de funcionalidades químicas y sus posiciones en el anillo fenol modulan su potencial antioxidante y la capacidad de eliminar radicales (Bustos et al., 2019).

Estos fenoles terpenoides son conocidos tradicionalmente por sus propiedades antinociceptivas, anestésicas locales, antiinflamatorias y antibacteriales. Además, existen reportes que muestran efectos de los terpenoides *in vitro* e *in vivo* en nematodos parásitos y sus potencialidades como compuestos antihelmínticos.

A principios de 1900, el timol fue utilizado para el tratamiento de ascáridos y anquilostomas en humanos (Lamson y Ward, 1932; Kaplan et al., 2014). Se ha visto que timol y carvacrol tienen actividad nematocida contra *A. suum in vitro* (Lei et al., 2010), y que timol inhibe la movilidad (Ferreira et al., 2016) y la eclosión de huevos (Katiki et al., 2017) en *H. contortus*. Estudios realizados con cerdos parasitados por *A. suum*, mostraron una reducción en la infección causada por los helmintos mediante un suplemento diario en la comida de combinaciones de aceites esenciales de plantas conteniendo timol (Kaplan et al., 2014). Sin embargo, el mecanismo molecular implicado en la acción de estos antihelmínticos no ha sido dilucidado completamente.

En este Capítulo de la Tesis se utilizó a *C. elegans* como modelo de nematodo parásito para explorar la acción antihelmíntica de tres terpenoides (timol, carvacrol y eugenol) y para dilucidar tanto el mecanismo como los blancos moleculares a través de los cuales ejercen sus efectos.

Objetivo general

El objetivo general de este Capítulo fue demostrar y caracterizar las propiedades antihelmínticas de terpenoides generados por especies vegetales (timol, carvacrol y eugenol) sobre *C. elegans* como modelo de nematodo parasítico, dilucidar sus blancos moleculares y su mecanismo de acción.

Objetivos específicos

- Determinar, mediante ensayos de parálisis en placa de agar, si los tres terpenoides paralizan rápidamente a *C. elegans* (cepa salvaje) y establecer sus órdenes de potencia.
- Estudiar las características de la parálisis inducida por los terpenoides midiendo la longitud relativa corporal de los nematodos salvajes luego de ser expuestos a los compuestos.
- Conocer la sensibilidad a los terpenoides en diferentes estadios del desarrollo de *C. elegans* salvajes mediante ensayos de parálisis en placas de agar.
- Determinar si los terpenoides afectan la eclosión de los huevos de nematodos salvajes, una propiedad asociada a la capacidad antihelmíntica de drogas.
- Dilucidar los blancos moleculares involucrados en la parálisis generada por los terpenoides mediante ensayos de parálisis en placa de agar utilizando cepas mutantes nulas en diversos receptores *Cys-loop*.
- Estudiar la combinación de drogas sobre patrones de comportamiento como una estrategia de terapia antihelmíntica para reducir la adquisición de resistencia en nematodos parásitos, utilizando timol como droga prototipo junto con antihelmínticos de uso cotidiano.
- Conocer los efectos de los terpenoides sobre L-AChRs y GABARs mediante registros de corrientes macroscópicas en configuración *whole-cell* utilizando células musculares de larva L1.
- Comprender en mayor detalle la acción de los terpenoides mediante registros de corrientes de canal único en configuración *cell-attached* utilizando células musculares de larva L1.

Desarrollo y Resultados

Los terpenoides -timol, carvacrol y eugenol- paralizan rápidamente a *C. elegans*

Para comprender como los terpenoides afectan rápidamente a *C. elegans* se comenzó por estudiar el efecto de timol. Se evaluó, mediante ensayos de parálisis en placa de agar, la respuesta de nematodos salvajes expuestos a timol en función del tiempo de exposición y de la concentración de la droga.

Nematodos salvajes hermafroditas sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en placas de agar conteniendo diferentes concentraciones de timol. Se registró la fracción de individuos paralizados a diferentes tiempos (cada 15 minutos) mediante el uso de un microscopio estereoscópico con zoom y de la herramienta para detectar movilidad, la pestaña. Como muestra la Figura 29 la parálisis fue dependiente tanto del tiempo de exposición como de la concentración de timol.

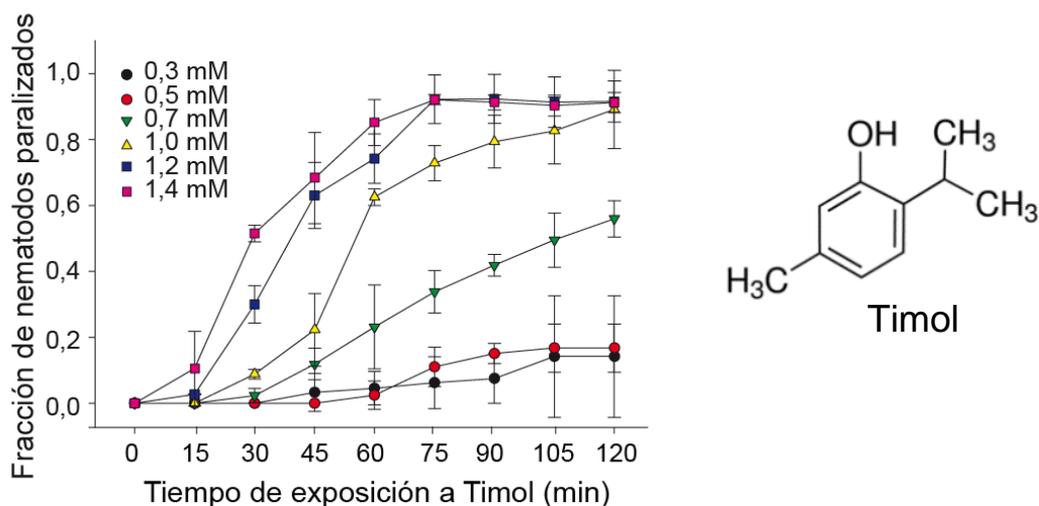


Figura 29: Los terpenoides inhiben la locomoción de *C. elegans* en función del tiempo de exposición y de la concentración de la droga. Izquierda: Nematodos salvajes hermafroditas sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en placas de agar conteniendo concentraciones crecientes de timol (0,3 – 1,4 mM). Se determinó la fracción de nematodos paralizados en función del tiempo. Los resultados se muestran como promedio \pm desvío estándar de al menos ensayos independientes para cada condición. Derecha: Estructura química del timol.

El 100 % de los nematodos se paralizó luego de una hora de exposición a concentraciones de timol superiores a 1,6 mM (Figura 30) y cerca del 90 % se paralizó luego de dos horas de exposición a concentraciones de timol mayores a 1 mM (Figura 29).

Además del timol, se testeó el efecto paralizante de otros terpenoides sobre *C. elegans*: carvacrol un isómero del timol y eugenol una molécula fenilpropanoide (Figura 30).

En primer lugar, se realizaron las curvas dosis-respuesta para la parálisis generada por los tres terpenoides luego de una hora de exposición (Figura 30). Se graficó para cada terpenoide la fracción de nematodos salvajes paralizados en función de la concentración utilizando *SigmaPlot 12.0*. Los puntos fueron ajustados mediante la Ecuación de *Hill* y se obtuvieron los valores de concentración efectiva 50 (EC_{50}).

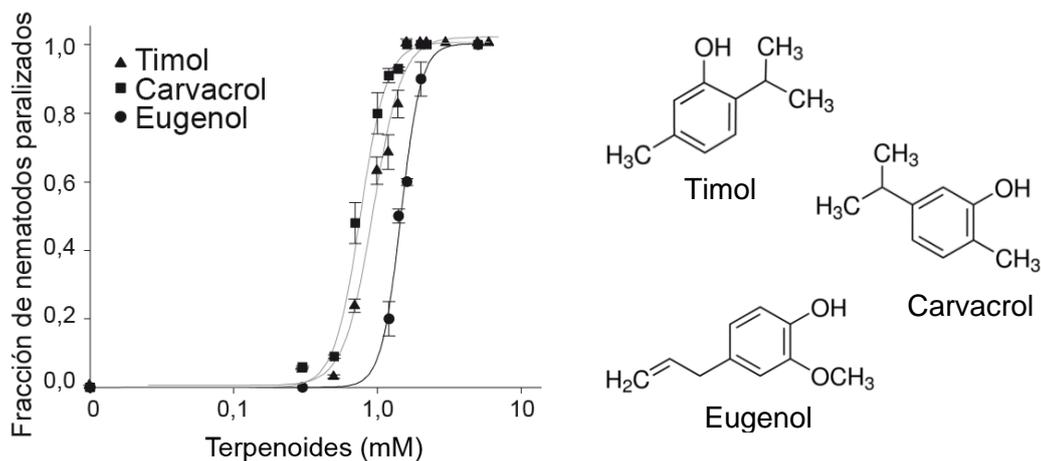


Figura 30: Curvas dosis-respuesta para cada terpenoide. Izquierda: El gráfico muestra la fracción de nematodos paralizados luego de una hora de exposición a diferentes concentraciones de timol, carvacrol y eugenol. La concentración efectiva 50 (EC_{50}) para timol fue de $0,95 \pm 0,03$ mM, carvacrol $0,80 \pm 0,13$ mM y eugenol $1,45 \pm 0,02$ mM. Los resultados son el promedio de 5 ensayos por cada condición \pm desvío estándar. Derecha: Estructuras químicas del timol, carvacrol y eugenol.

Para determinar los valores de EC_{50} en nematodos salvajes expuestos a los terpenoides durante un tiempo más prolongado (dos horas), se realizaron los mismos ensayos de parálisis en placa de agar. Para todos ellos, el valor de EC_{50} fue menor al prolongar el tiempo de exposición. Para timol el EC_{50} obtenido fue de $0,95 \pm 0,03$ mM a la hora de exposición y $0,70 \pm 0,02$ mM a las dos horas de exposición, para carvacrol fue de $0,80 \pm 0,13$ mM a la hora y $0,60 \pm 0,023$ mM a las dos horas, y para eugenol $1,45 \pm 0,02$ mM a la hora y $1,10 \pm 0,02$ mM a las dos horas ($n > 5$ ensayos independientes para cada condición).

Por lo tanto, se puede concluir en que los tres terpenoides generan inhibición en la locomoción de *C. elegans* dependiente de la concentración. Según el valor de EC_{50} el orden de potencia para paralizar al nematodo fue el siguiente: carvacrol > timol > eugenol.

1. Características de la parálisis inducida por los terpenoides

Aunque los efectos paralizantes de los terpenoides ya habían sido reportados en parásitos y en *C. elegans* (Lei et al., 2010; Abdel-Rahman et al., 2013), las características de la parálisis inducida por estos compuestos no habían sido descritas.

Para estudiar el tipo de parálisis inducida por los terpenoides (flácida, espástica o estacionaria) se llevaron a cabo ensayos de parálisis en placa de agar. Nematodos salvajes hermafroditas sincronizados en estadio adulto joven fueron expuestos a timol 2 mM, carvacrol 2 mM, eugenol 2 mM y levamisol 0,2 mM en placas de agar durante dos horas. Se tomaron fotografías utilizando una cámara digital montada en un microscopio estereoscópico con zoom y luego se midió la RBL de cada individuo mediante el *software* FIJI-ImageJ. Se realizaron los respectivos controles midiendo la RBL de nematodos colocados durante dos horas en placas de agar conteniendo el vehículo utilizado para los terpenoides, DMSO al 0,8 %. El vehículo no modificó la RBL de los nematodos.

Se utilizó levamisol como control ya que al actuar como agonista de los L-AChRs genera contracción de los músculos de la pared del cuerpo del nematodo, y en consecuencia produce parálisis tipo espástica. Como se esperaba, dicha droga antihelmíntica generó una reducción en la longitud corporal de los nematodos. La RBL de los nematodos en presencia de levamisol, comparada con la obtenida en las placas de agar control, fue de $0,93 \pm 0,05$ ($p < 0,05$). En cambio, la RBL de nematodos expuestos a los terpenoides no fue modificada significativamente en comparación con la de los nematodos expuestos a la condición control conteniendo DMSO. Los valores de RBL fueron $1 \pm 0,08$ para timol, $1 \pm 0,09$ para carvacrol, $1 \pm 0,1$ para eugenol y $1 \pm 0,06$ para el vehículo DMSO ($p > 0,15$) ($n > 5$ ensayos independientes para cada condición).

Mediante estos resultados se demostró que los terpenoides no producen parálisis tipo flácida ni tipo espástica en *C. elegans*.

2. Sensibilidad a los terpenoides en diferentes estadios de desarrollo de *C. elegans*

Con el objetivo de comparar la sensibilidad a los terpenoides en diferentes estadios del desarrollo de *C. elegans*, se llevaron a cabo ensayos de comportamiento y se expusieron larvas correspondientes al primer estadio larval L1 y nematodos adultos jóvenes a los terpenoides en estudio.

Larvas L1 y nematodos adultos jóvenes salvajes fueron colocados en placas de agar conteniendo timol, eugenol o carvacrol en diversas concentraciones: 1,2 mM, 1,4 mM, y 1,6 mM, y se evaluó la fracción de nematodos paralizados luego de una y dos horas de exposición.

Como muestra la Figura 31, los tres terpenoides afectaron significativamente la locomoción de los nematodos en ambos estadios de desarrollo.

Se realizaron los controles correspondientes, y, para ello, se colocaron individuos salvajes, correspondientes a los dos estadios de desarrollo estudiados, en placas control conteniendo agar junto con el vehículo DMSO. No se encontraron nematodos paralizados durante los ensayos controles.

Mediante estos ensayos se demostró que durante la primera hora de exposición las larvas L1 son más sensibles a los terpenoides en comparación con los nematodos adultos jóvenes ($n = 5$ ensayos para cada condición).

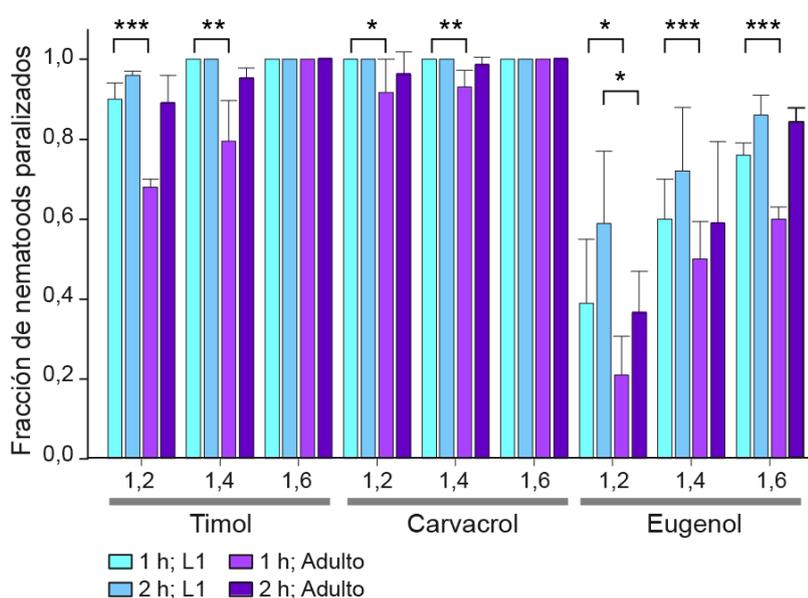


Figura 31: El gráfico de barras muestra la fracción de nematodos paralizados, adultos y larvas L1, en presencia de los terpenoides. Nematodos salvajes hermafroditas sincronizados en estadio larval L1 y adultos jóvenes fueron expuestos durante una y dos horas a diversas concentraciones de terpenoides (1,2; 1,4; 1,6 mM) en placas de agar. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cinco ensayos independientes para cada condición. Aproximadamente 30 nematodos fueron utilizados por placa. El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre larvas L1 y nematodos adultos para cada grupo (1 o 2 horas de exposición).

Los terpenoides afectan la eclosión de los huevos de *C. elegans*

Para determinar si los terpenoides afectan la eclosión de los huevos, una propiedad indicativa de la capacidad antihelmíntica de drogas, se llevó a cabo un ensayo de eclosión de huevos con ciertas modificaciones para *C. elegans* (Taylor et al., 2002).

Se obtuvieron huevos de *C. elegans* mediante el tratamiento de nematodos salvajes hermafroditas en estadio adultos grávidos con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) e hidróxido de sodio (NaOH). Los huevos fueron expuestos a *buffer* M9 conteniendo timol, carvacrol o eugenol 1,2 mM durante 12 horas. Se realizaron los respectivos controles exponiendo huevos a M9 solo y a M9 conteniendo el vehículo DMSO. Luego de las 12 horas de exposición, los huevos fueron lavados con M9 y se los colocó en placas de Petri nuevas conteniendo únicamente agar. Mediante inspección estereoscópica con zoom se determinó la fracción de huevos sin eclosionar como así también la cantidad de larvas L1 presentes en cada condición.

Como muestra la Figura 32, se determinó que los tres terpenoides inhiben la eclosión de los huevos de *C. elegans*. El efecto inhibitorio fue mayor con carvacrol en comparación con timol y eugenol, resultando así el mismo orden de potencia que se obtuvo en los ensayos previos de parálisis en placa de agar. La fracción de huevos sin eclosionar en presencia de M9 junto con el vehículo DMSO no mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la condición en ausencia de DMSO, y aproximadamente solo el 10 % de los huevos no eclosionaron en ambos casos (Figura 32).

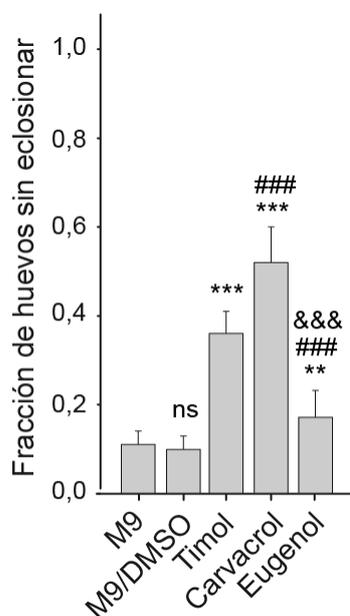


Figura 32: El gráfico de barras representa la capacidad de los terpenoides para inhibir la eclosión de los huevos. Se muestra la fracción de huevos sin eclosionar luego de ser expuestos a *buffer* M9, M9/DMSO (0,58 %) o M9 conteniendo 1,2 mM de timol, carvacrol o eugenol. Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar de 3 ensayos diferentes para cada condición. El símbolo * indica diferencias con el grupo control, # diferencias con el tratamiento de timol, & diferencias con el tratamiento de carvacrol, ns: diferencia no estadísticamente significativa. Dos símbolos indican $p < 0,01$ y tres símbolos $p < 0,001$.

Se demostró además que el efecto inhibitorio en la eclosión es irreversible dado que los huevos tratados durante 12 horas con los terpenoides, en sus respectivas concentraciones EC_{50} , lavados con *buffer* M9, colocados en placas de agar sin compuesto e incubados durante 12 horas adicionales, no eclosionaron.

El L-AChR y el receptor UNC-49 son los blancos moleculares involucrados en la parálisis generada por los terpenoides

Para determinar si los receptores *Cys-loop* están involucrados en los efectos paralizantes rápidos de los terpenoides se exploró, mediante ensayos de comportamiento, la acción de timol, carvacrol y eugenol sobre cepas mutantes. Estos ensayos se basaron en la hipótesis de que la ausencia de un blanco molecular de una droga en una cepa mutante generará resistencia a dicha droga en los nematodos.

Se llevaron a cabo ensayos de parálisis en placa de agar. En cada ensayo se expuso una de las cepas mutantes en estudio en simultáneo con la cepa salvaje como control a los diversos terpenoides. Todos los nematodos estaban sincronizados en estadio adulto joven. Se utilizaron las concentraciones de terpenoides correspondientes al EC_{50} obtenido para nematodos salvajes: timol 1 mM, carvacrol 0,8 mM y eugenol 1,45 mM, como así también concentraciones más elevadas, y se evaluó la fracción de nematodos paralizados a la hora y a las dos horas de exposición.

En primer lugar, se testearon las cepas mutantes que carecen de los principales receptores *Cys-loop* involucrados en la locomoción de *C. elegans*: el L-AChR, homólogo al nAChR muscular de mamífero (Rand, 2007), y el receptor UNC-49, homólogo al GABA_AR de mamífero (Bamber et al., 2003).

La cepa mutante CB904 (*unc-38(e264) I*) carece de L-AChRs funcionales debido a la ausencia de la subunidad esencial UNC-38. La fracción de nematodos mutantes paralizados, luego de ser expuestos a las concentraciones correspondientes a los EC_{50} de los terpenoides, fue notablemente menor con respecto a los nematodos salvajes. Menos del 20 % de los nematodos mutantes se paralizó luego de una o dos horas de exposición a los tres terpenoides (Figura 33).

Al incrementar la concentración de los terpenoides con respecto a los valores de EC_{50} , timol 1,2 mM, carvacrol 1,2 mM y eugenol 1,6 mM, se obtuvo un aumento en la fracción de nematodos mutantes paralizados. Sin embargo, la diferencia entre los efectos de los terpenoides en la cepa mutante y en los nematodos salvajes continuó siendo estadísticamente significativa ($p < 0,05$). La cepa mutante CB904 fue $2,5 \pm 1,1$ y $1,5 \pm 0,7$ veces menos sensible que la cepa salvaje luego de una y dos horas de exposición a timol 1,2 mM, respectivamente (Figura 33).

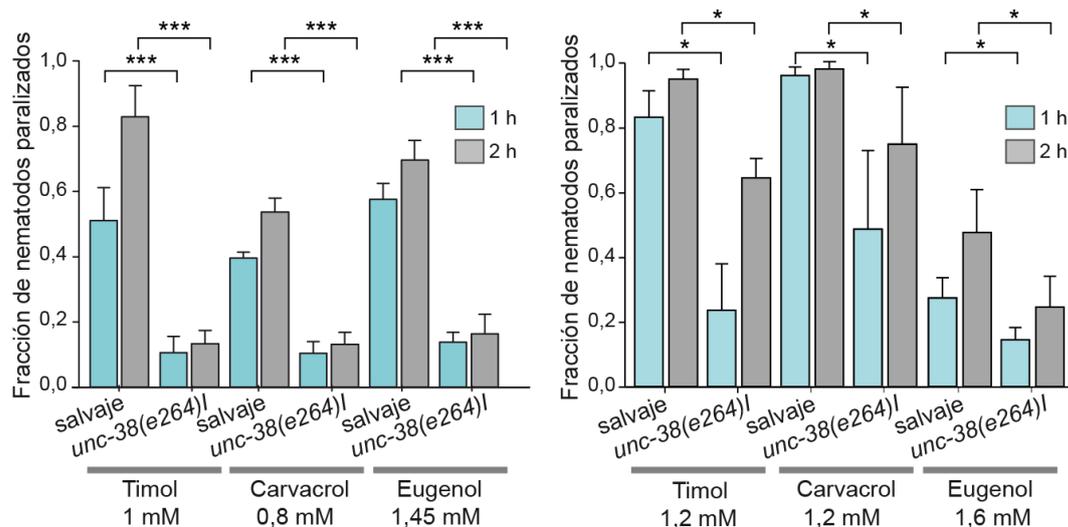


Figura 33: Nematodos adultos jóvenes salvajes y mutantes que carecen de L-AChRs funcionales *unc-38(e264) I*, fueron colocados en placas de agar conteniendo timol, carvacrol o eugenol en sus respectivas concentraciones EC_{50} calculadas para la cepa salvaje (izquierda) y concentraciones más elevadas (derecha). Se contabilizó la fracción de nematodos paralizados en cada condición. Se utilizaron 30 nematodos por placa. Cada barra representa el promedio de al menos 5 ensayos con su respectivo desvío estándar. El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre nematodos salvajes y mutantes dentro del mismo grupo (1 o 2 horas de exposición) (* $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$).

Sin embargo, al igual que lo observado con los nematodos salvajes, la exposición a una concentración elevada de terpenoides (2 mM) durante dos horas generó una parálisis aproximada del 100 % en la cepa mutante. El porcentaje de nematodos paralizados a concentraciones 2 mM fue: para timol $0,996 \pm 0,0089$ (salvaje) y $0,970 \pm 0,042$ (*unc-38(e264) I*) ($p = 0,2$), para carvacrol: $1,00 \pm 0,004$ (salvaje) y $0,960 \pm 0,043$ (*unc-38(e264) I*) ($p = 0,17$) y para eugenol: $0,968 \pm 0,0041$ (salvaje) y $0,966 \pm 0,045$ (*unc-38(e264) I*) ($p = 0,9$).

Estos resultados indican que la cepa mutante CB904 (*unc-38(e264) I*) es parcialmente resistente a los tres terpenoides.

La cepa mutante CB407 (*unc-49(e407) III*) carece de receptores UNC-49 funcionales debido a la ausencia de la subunidad UNC-49B. La fracción de nematodos mutantes paralizados se redujo con respecto a los nematodos salvajes, luego de ser expuestos a las concentraciones EC_{50} de los terpenoides. Como muestra la Figura 34, menos del 20 % de los nematodos mutantes se paralizaron a la hora y a las dos horas de exposición.

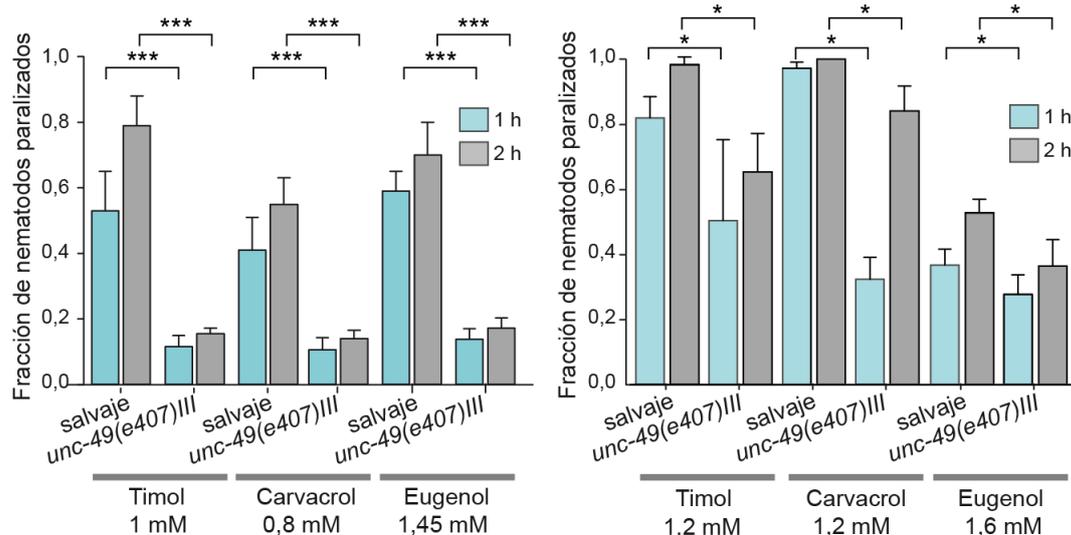


Figura 34: Nematodos adultos jóvenes salvajes y mutantes que carecen de receptores UNC-49 funcionales *unc-49(e407) III* fueron colocados en placas de agar conteniendo timol, carvacrol o eugenol en sus respectivas concentraciones EC₅₀, calculadas para la cepa salvaje (izquierda) y concentraciones más elevadas (derecha). Se contabilizó la fracción de nematodos paralizados en cada condición. Se utilizaron 30 nematodos por placa. Cada barra representa el promedio de al menos 5 ensayos con su respectivo desvío estándar. El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre nematodos salvajes y mutantes dentro del mismo grupo (1 o 2 horas de exposición) (*p<0,05 y ***p<0,001).

Como se observó para la mutante CB904, la parálisis de la cepa mutante CB407 (*unc-49(e407) III*) también fue dependiente de la concentración. La fracción de nematodos paralizados aumentó al incrementar la concentración de los terpenoides a 1,2 mM, 1,2 mM y 1,6 mM para timol, carvacrol y eugenol, respectivamente, con respecto a la fracción de paralizados a concentraciones correspondientes a su EC₅₀. Los mutantes fueron $1,97 \pm 0,7$ y $1,35 \pm 0,15$ veces menos sensibles a timol 1,2 mM que los nematodos salvajes a la hora y a las dos horas de exposición, respectivamente (Figura 34).

Además, aproximadamente el 100 % de los nematodos mutantes CB407 (*unc-49(e407) III*) se paralizaron al ser expuestos durante dos horas a los terpenoides en una concentración 2 mM. La fracción de nematodos mutantes paralizados a 2 mM fue: $0,97 \pm 0,05$ ($p = 0,3$), $0,972 \pm 0,027$ ($p = 0,09$) y $0,95 \pm 0,057$ ($p = 0,5$) para timol, carvacrol y eugenol, respectivamente.

Estos resultados indican que la cepa mutante CB407 (*unc-49(e407) III*) también es parcialmente resistente a los tres compuestos. Por lo tanto, se demostró que el L-AChR y el receptor UNC-49 están involucrados en la parálisis inducida por los terpenoides.

1. El N-AChR tiene un rol en la parálisis generada por los terpenoides

Además de las cepas que carecen de los principales receptores implicados en la contracción y relajación muscular de *C. elegans*, se testeó la contribución de otros receptores al efecto paralizante de los terpenoides.

La cepa RB918 (*acr-16(ok789) V*) carece del receptor homopentamérico de ACh sensible a nicotina (N-AChR o ACR-16, homólogo al receptor nicotínico de mamífero $\alpha 7$ (Touroutine et al., 2005)), que también está presente en el músculo del nematodo. Nematodos mutantes RB918 (*acr-16(ok789) V*) fueron expuestos a los terpenoides en las concentraciones correspondientes al EC_{50} determinado para la cepa salvaje. La fracción de nematodos mutantes paralizados fue levemente menor a la de nematodos salvajes, sin embargo, las diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 35).

Se testaron concentraciones más elevadas al valor de EC_{50} para timol. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fracción de nematodos mutantes paralizados con timol 1,2 mM (Figura 35) y 2 mM ($0,98 \pm 0,04$, $p=0,4$), con respecto a nematodos salvajes.

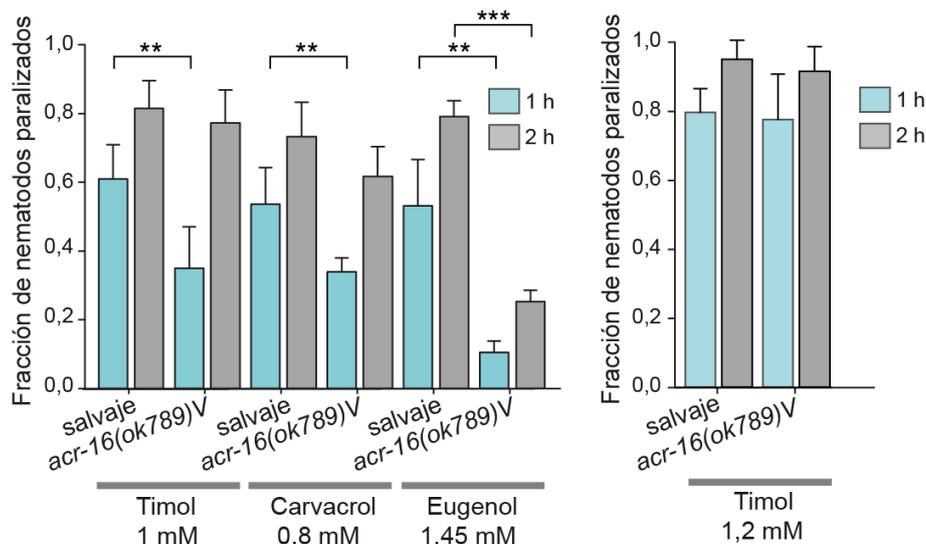


Figura 35: Nematodos adultos jóvenes salvajes y mutantes *acr-16(ok789) V* que carecen del AChR homopentamérico sensible a nicotina (N-AChRs o ACR-16), fueron colocados en placas de agar conteniendo timol, carvacrol o eugenol en sus respectivas concentraciones EC_{50} , calculadas para la cepa salvaje (izquierda) y a una concentración mayor de timol (derecha). Se contabilizó la fracción de nematodos paralizados en cada condición. Se utilizaron 30 nematodos por placa. Cada barra representa el promedio de al menos 5 ensayos con su respectivo desvío estándar. El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre nematodos salvajes y mutantes dentro del mismo grupo (1 o 2 horas de exposición) (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

Mediante estos resultados, se demostró que el N-AChR tiene un rol en la parálisis generada por los terpenoides, a pesar de que el efecto no fue tan evidente como el mediado por los receptores de GABA y el L-AChR.

2. Los GluCl_s y los receptores de serotonina no están involucrados en la parálisis generada por los terpenoides

La cepa DA1316 (*avr-14(ad1305) I; avr-15(vu227) glc-1(pk54) V*) que carece de tres genes que codifican para las subunidades AVR-14, AVR-15 y GLC-1 del receptor de glutamato permeable a cloruro (GluCl) presenta alta resistencia a IVM (Dent et al., 2000). Nematodos mutantes DA1316 y nematodos salvajes fueron expuestos a los tres terpenoides en las concentraciones EC₅₀ calculadas previamente para nematodos salvajes y a timol 1,2 mM (Figura 36). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa mutante y la salvaje en ninguna condición.

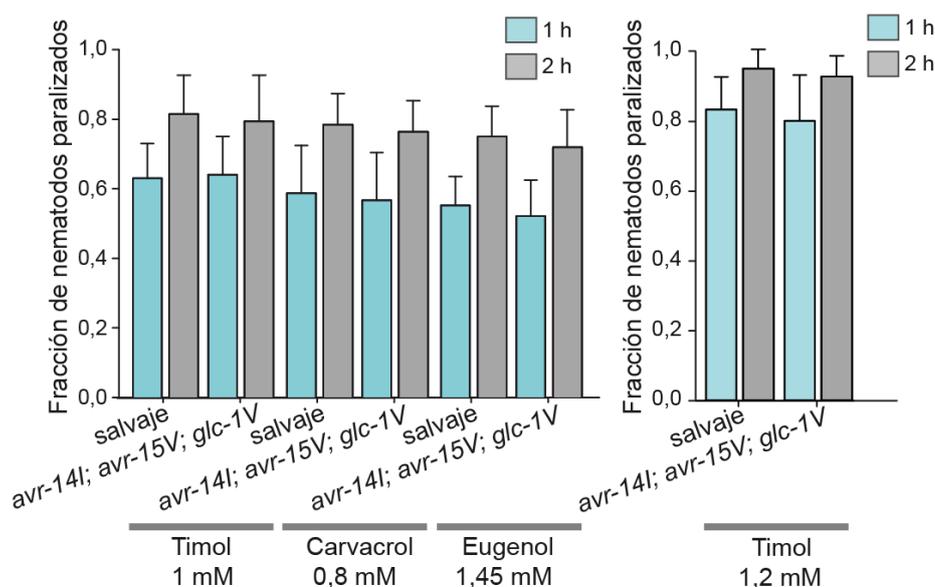


Figura 36: Nematodos adultos jóvenes salvajes y mutantes *avr-14(ad1305) I; avr-15(vu227); glc-1(pk54) V* en subunidades del receptor de glutamato permeable a cloruro (GluCl), fueron colocados en placas de agar conteniendo timol, carvacrol o eugenol en sus respectivas concentraciones EC₅₀, calculadas para la cepa salvaje (izquierda), y a una concentración mayor de timol (derecha). Se contabilizó la fracción de nematodos paralizados en cada condición. Se utilizaron 30 nematodos por placa. Cada barra representa el promedio de al menos 5 ensayos con su respectivo desvío estándar.

Mediante estos resultados se demostró que los GluCl_s no están involucrados en la actividad paralizante de los terpenoides.

También se testearon cepas mutantes en receptores de serotonina de *C. elegans* ya que el sistema serotoninérgico controla varios comportamientos en los nematodos. La cepa AQ866 (*ser-4(ok512) III*) carece del receptor metabotrópico de serotonina SER-4, la cepa DA1814 (*ser-1(ok345) X*) carece del receptor metabotrópico de serotonina SER-1 y la cepa MT9668 (*mod-1(ok103) V*) carece del canal de cloruro activado por serotonina MOD-1. Los ortólogos de mamífero para estos receptores son 5-HT₁, 5-HT₂ y el GlyR, respectivamente (Ranganathan et al., 2000; Gurel et al., 2012).

Nematodos mutantes en los receptores de serotonina y nematodos salvajes fueron expuestos a timol 1 mM, concentración correspondiente al EC₅₀ calculada previamente para nematodos salvajes, y a una concentración más elevada (1,2 mM).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la fracción de nematodos salvajes paralizados y la de los mutantes expuestos a timol 1 mM ($p > 0,20$) y 1,2 mM ($p > 0,30$) (Figura 37), indicando que los receptores de serotonina no están involucrados en la parálisis inducida por timol.

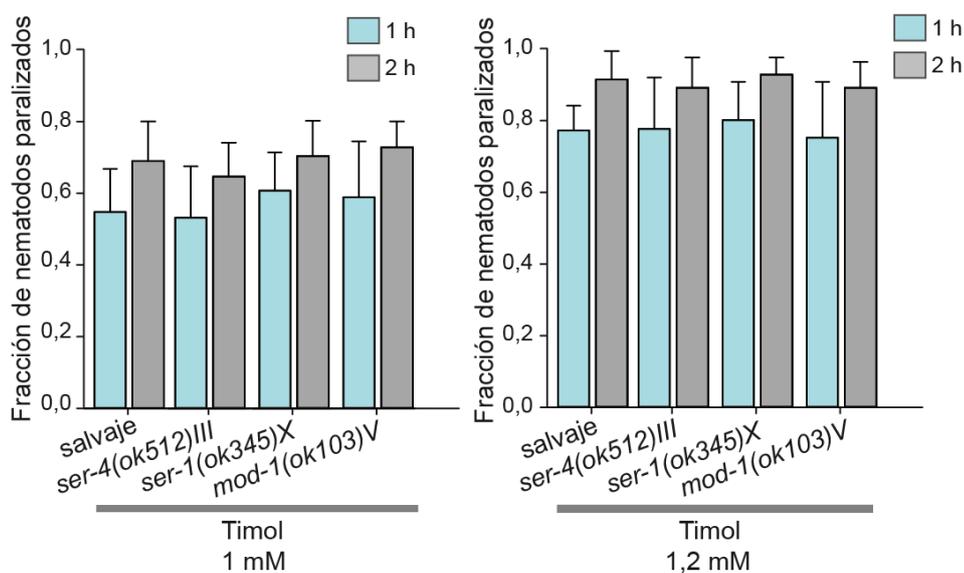


Figura 37: Nematodos adultos jóvenes salvajes y mutantes *ser-4(ok512) III* que carecen del receptor metabotrópico de serotonina (SER-4), *ser-1(ok345) X* que carecen del receptor metabotrópico de serotonina (SER-1) y *mod-1(ok103) V* que carecen del canal de cloruro activado por serotonina (MOD-1) fueron colocados en placas de agar conteniendo timol 1 mM (izquierda) y 1,2 mM (derecha). Se contabilizó la fracción de nematodos paralizados en cada condición. Se utilizaron 30 nematodos por placa. Cada barra representa el promedio de al menos 5 ensayos con su respectivo desvío estándar.

Quimioterapia combinada: timol junto con drogas antihelmínticas clásicas

En la terapia antihelmíntica, la combinación de drogas es una estrategia utilizada para reducir la adquisición de resistencia en los nematodos parásitos. Se utilizó timol como droga prototipo, y se la combinó con drogas antihelmínticas utilizadas actualmente. Se llevaron a cabo ensayos de parálisis en placa de agar con timol solo o en combinación con: levamisol que activa el L-AChR y genera parálisis tipo espástica, piperazina que activa receptores UNC-49 y genera parálisis tipo flácida o ivermectina que activa los GluCl1 y también actúa sobre los receptores de GABA (Hernando y Bouzat, 2014). Además, se evaluó el porcentaje de nematodos paralizados con cada una de las drogas antiparasitarias de manera individual.

Nematodos hermafroditas salvajes sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en placas de agar conteniendo levamisol 0,03 mM solo o la combinación levamisol 0,03 mM y timol 1,2 mM. Luego de una hora de exposición, aproximadamente el 15 % de los nematodos se paralizó en presencia de levamisol solo. La combinación de levamisol y timol paralizó aproximadamente al 80 % de los individuos (Figura 38).

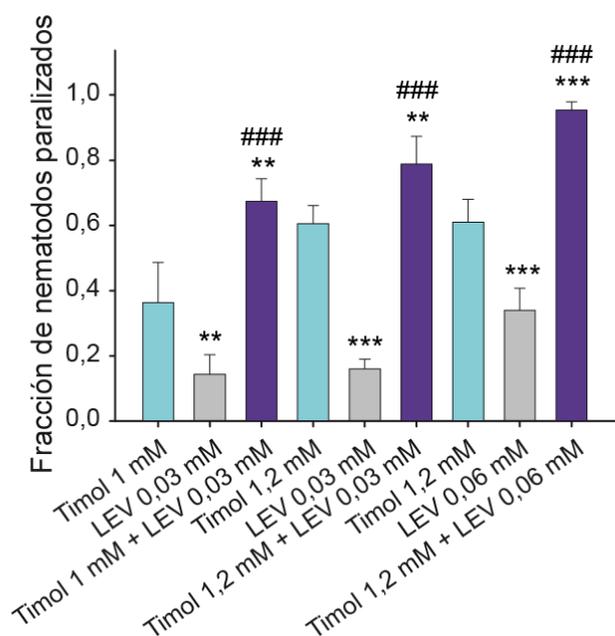


Figura 38: Timol y su combinación con levamisol. El gráfico de barras muestra la fracción de nematodos paralizados luego de una hora de exposición en placas de agar conteniendo timol 1 y 1,2 mM, levamisol (LEV) 0,03 y 0,06 mM y las combinaciones timol 1 mM/levamisol 0,03 mM, timol 1,2 mM/levamisol 0,03 mM, timol 1,2 mM/levamisol 0,06 mM. Los resultados se muestran como el promedio de al menos cinco ensayos independientes para cada condición \pm desvío estándar. Al menos 30 nematodos fueron utilizados por placa. El símbolo * indica diferencias con el grupo control (M9) y # indica diferencias con el tratamiento de timol. Un solo símbolo indica $p < 0,05$, dos símbolos $p < 0,01$ y tres símbolos $p < 0,001$.

Una forma de determinar si el efecto de una combinación de drogas es aditivo, sinérgico o antagónico es mediante el teorema de Chou-Talalay's incluido en el *software Compusyn*. Dicho teorema estima un Índice de Combinación (CI) que permite clasificar y cuantificar los efectos obtenidos con las drogas combinadas. Este es un método cuantitativo ampliamente utilizado que permite determinar sinergismo ($CI < 1$), antagonismo ($CI > 1$) o efectos aditivos ($CI = 1$) entre drogas *in vitro*, tanto en animales como en ensayos clínicos (Chou y Talalay, 1984; Chou, 2006).

Para poder llevar a cabo dicho análisis se utilizó un rango más amplio de concentraciones tanto para timol como para levamisol y sus combinaciones. En el mismo conjunto de experimentos, se midió la fracción de nematodos paralizados a diferentes concentraciones de timol (0,3 mM - 1,4 mM) y levamisol (0,005 mM - 0,06 mM), y con tres combinaciones diferentes de drogas (levamisol 0,03 mM/timol 1 mM; levamisol 0,03 mM/timol 1,2 mM y levamisol 0,06 mM/timol 1,2 mM) (Figura 38). Se encontró que cada combinación estudiada generaba una fracción de nematodos paralizados mayor que cada droga aplicada individualmente en la misma concentración.

El valor CI determinado por el *software CompuSyn* para cada combinación fue: 0,9 para levamisol 0,03 mM/timol 1 mM, 0,86 para levamisol 0,03 mM/timol 1,2 mM y 0,53 para levamisol 0,06 mM/timol 1,2 mM. Estos resultados indican que la acción de la combinación levamisol/timol podría ser considerada ligeramente sinérgica (Chou y Talalay, 1984; Chou y Martín, 2005).

En ensayos de comportamiento similares, se determinó el efecto de la combinación de drogas timol/piperazina. Se realizaron ensayos de parálisis en placa de agar conteniendo piperazina 30 mM sola o la combinación piperazina 30 mM con timol 1,2 mM, y se evaluó la fracción de nematodos hermafroditas salvajes adultos jóvenes paralizados luego de una hora de exposición. Ya ha sido reportado previamente que es necesario utilizar elevadas concentraciones de la droga antihelmíntica piperazina en los ensayos de parálisis en placa de agar para generar efecto en los nematodos (Hernando y Bouzat, 2014).

La exposición de nematodos salvajes a piperazina sola generó aproximadamente un 10 % de parálisis, mientras que la combinación de piperazina con timol generó un 38 % de nematodos paralizados (Figura 39), indicando que el efecto fue menor al generado por timol solo (54 %). Por lo tanto, la combinación timol/piperazina resultó antagónica.

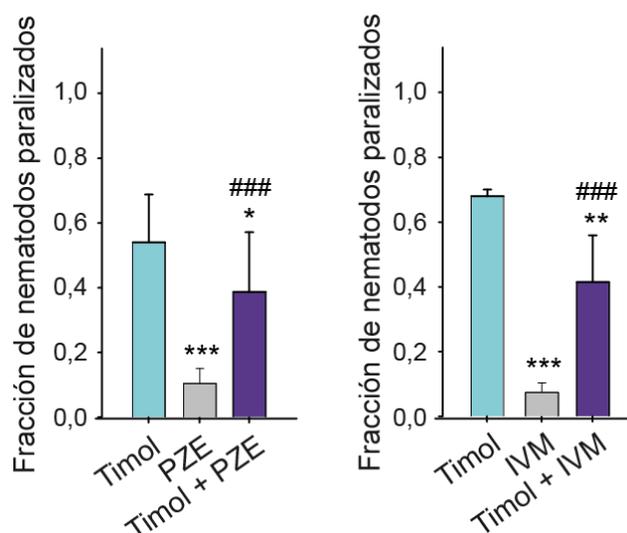


Figura 39: Los gráficos de barras muestran la fracción de nematodos salvajes adultos jóvenes paralizados luego de una hora de exposición a: timol 1,2 mM, piperazina (PZE) 30 mM y la combinación de ambos (izquierda) y timol 1,2 mM, ivermectina (IVM) 0,3 mM y la combinación de ambos (derecha). Los resultados se muestran como el promedio de al menos 5 ensayos independientes para cada condición \pm desvío estándar. Al menos 30 nematodos fueron utilizados por placa. El símbolo * indica diferencias con el grupo control (M9) y # indica diferencias con el tratamiento de timol. Un solo símbolo indica $p < 0,05$, dos símbolos $p < 0,01$ y tres símbolos $p < 0,001$.

Las lactonas macrocíclicas presentan un potente y amplio espectro antiparasitario a dosis bajas. Nematodos hermafroditas salvajes en estadio adulto joven fueron expuestos, en un ensayo de parálisis en placa de agar, a ivermectina 0,3 mM sola o a la combinación ivermectina 0,3 mM y timol 1,2 mM.

Luego de una hora de exposición a ivermectina, aproximadamente el 7 % de los nematodos se paralizó. La mayoría presentaba parálisis tipo estacionaria, es decir estaban paralizados, pero al tocarlos con la pestaña respondían contrayendo la musculatura corporal, como se reportó previamente (Hernando y Bouzat, 2014) (Figura 38). La combinación de ivermectina y timol generó un 41 % de parálisis (Figura 39), lo cual fue menor al efecto generado por timol solo (68 %).

En conclusión, la combinación timol/levamisol fue la más efectiva en paralizar a *C. elegans* y en comparación con la capacidad paralizante de cada droga aplicada por separado, mientras que la combinación timol con piperazina o IVM no generó un efecto adicional importante.

Efectos de la combinación de drogas sobre la eclosión de huevos

Para determinar si la combinación de terpenoides con drogas antihelmínticas clásicas afecta la eclosión de los huevos, se realizó el ensayo de eclosión de huevos para *C. elegans* antes mencionado. Los huevos fueron expuestos a M9, M9/DMSO o M9 conteniendo timol, timol-levamisol, timol-piperazina o timol-ivermectina durante 12 horas (Figura 40).

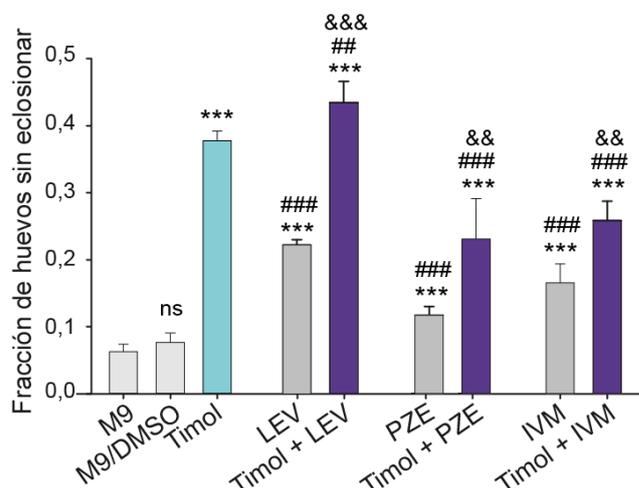


Figura 40: El gráfico de barras muestra la fracción de huevos sin eclosionar luego de ser expuestos a M9, M9/DMSO (0,58%), timol 1,2 mM, levamisol (LEV) 0,2 mM, piperazina (PZE) 25 mM, ivermectina (IVM) 0,02 mM y las combinaciones. Los resultados se muestran como el promedio de 3 ensayos diferentes para cada condición \pm desvío estándar. El símbolo * indica diferencias con el grupo control (M9), # indica diferencias con el tratamiento de timol, & indica diferencias con los agentes antihelmínticos y ns: diferencias no estadísticamente significativas. Un solo símbolo indica $p < 0,05$, dos símbolos $p < 0,01$ y tres símbolos $p < 0,001$.

Se demostró que todas las combinaciones de drogas testeadas generan inhibición en la eclosión de huevos. Sin embargo, comparado con los efectos generados por timol solo, el efecto de la combinación timol/levamisol fue ligeramente mayor y para timol/piperazina y timol/ivermectina menor.

Los terpenoides no son capaces de activar al L-AChR ni al receptor UNC-49

Para confirmar que los principales receptores *Cys-loop* musculares involucrados en la contracción y relajación muscular, el L-AChR y el receptor UNC-49, son modulados por los terpenoides, se realizaron registros de corrientes macroscópicas en configuración *whole-cell* a -70 mV potencial de pipeta.

Se aislaron células embrionarias de *C. elegans*, que luego de 24 horas en cultivo se diferencian a células musculares correspondientes al estadio larval L1. Como la cepa PD4251 utilizada contiene *myo::GFP* y expresan GFP de manera estable en músculo, fue posible reconocer las células musculares bajo óptica de fluorescencia fácilmente. Las células musculares L1 inmersas en la ECS fueron selladas con una pipeta de vidrio conteniendo ICS. Luego se rompió el sello para poder perforar la célula y tener acceso al interior celular. Mediante un sistema de perfusión se aplicó un pulso de ACh o GABA (0,5 – 10 mM) durante 1 segundo y se registraron las corrientes macroscópicas generadas por todos los receptores presentes en la membrana celular.

En el Laboratorio de Neurofisiología y Farmacología molecular del INIBIBB ya han sido descritas en detalle las corrientes generadas por ACh o GABA en células musculares L1 de la cepa salvaje PD4251 correspondientes a los receptores L-AChR y UNC-49, respectivamente (Hernando et al., 2012; Hernando y Bouzat, 2014).

Por reportes previos realizados en el laboratorio se sabe que en células musculares L1 un pulso de ACh 500 μ M genera corrientes que alcanzan el pico máximo en aproximadamente 20 segundos (t_{20-80} : 16 ± 10 ms) y decaen lentamente en presencia continua del agonista ACh. El pico promedio de corriente (I_{peak}) es de -76 ± 18 pA a -70 mV. La desensibilización se ajusta con una función exponencial doble $\tau_{fast} = 90 \pm 30$ ms (área relativa de $0,40 \pm 0,09$) y $\tau_{slow} = 580 \pm 90$ ms (área relativa de $0,21 \pm 0,08$). Bajo un pulso sostenido de agonista, la corriente en estado estacionario (I_{∞}) no es cero debido probablemente a que los receptores se recuperan de la desensibilización. La relación entre estado estacionario y pico de corriente ($I_{\infty}/I_{peak} = 0,32 \pm 0,08$) es indicativa de la extensión de la desensibilización (Hernando et al., 2012).

Por otro lado, se sabe que en células musculares L1, GABA 1 mM genera corrientes que alcanzan el pico máximo en menos de 4 ms (t_{20-80} : 4 ± 2 ms). El pico promedio de la corriente (I_{peak}) es de $-21,7 \pm 11$ pA/pF a -70 mV. La corriente decae en presencia constante de GABA hasta alcanzar valores de corriente de estado estacionario (I_{∞}) cercanas a cero ($I_{\infty}/I_{peak} = 0,05 \pm 0,03$) indicando desensibilización completa. La desensibilización se ajusta con una función exponencial doble $\tau_{fast} = 19 \pm 9$ ms y $\tau_{slow} = 85 \pm 40$ ms (Hernando y Bouzat, 2014).

Al perfundir las células en la configuración *whole-cell* con ECS conteniendo timol, carvacrol o eugenol 0,1 mM durante 1 segundo en ausencia de agonistas, no se registraron corrientes macroscópicas. De esta manera se demostró que, a las concentraciones testeadas, los terpenoides no fueron capaces de activar los L-AChRs ni los receptores de GABA ($n = 12$ células).

Los terpenoides inhiben las corrientes macroscópicas provenientes de la activación de L-AChRs y de los receptores UNC-49

Para estudiar si estos compuestos son capaces de modular las corrientes generadas por los agonistas, se llevó a cabo un protocolo de preincubación. En primer lugar, utilizando células musculares L1 aisladas de la cepa PD4251, se registraron las corrientes control, es decir corrientes evocadas por pulsos con los agonistas ACh o GABA durante 1 segundo. Luego las células fueron expuestas durante un minuto a 0,1 mM de cada terpenoide (uno por vez). Posteriormente se aplicaron pulsos de 1 segundo con los agonistas ACh o GABA, y se registraron las corrientes macroscópicas (corrientes tratadas).

Luego de la preincubación, el pico de la corriente evocada por ACh o GABA se redujo a $66 \pm 10 \%$ y $78 \pm 9 \%$ en presencia de timol, $56 \pm 24 \%$ y $54 \pm 32 \%$ en presencia de carvacrol y $75 \pm 19 \%$ y $73 \pm 16 \%$ en presencia de eugenol, respectivamente ($n = 5$ células por condición, Figura 41), en comparación con las corrientes controles obtenidas en la misma célula.

Para evaluar la recuperación de las corrientes, luego del protocolo de preincubación se realizó un lavado con ECS durante 1 minuto y se aplicaron pulsos de 1 segundo con los agonistas ACh o GABA. El pico de las corrientes fue recuperado casi en su totalidad. Para las respuestas de los L-AChR y UNC-49, las corrientes recuperadas fueron: $92 \pm 13 \%$ y $90 \pm 16 \%$ para timol, $85 \pm 15 \%$ y $86 \pm 14 \%$ para carvacrol y $86 \pm 20 \%$ y $98 \pm 16 \%$ para eugenol, respectivamente. Con estos resultados se demostró que la inhibición de los L-AChR y GABAR generada por los terpenoides es reversible.

Concentraciones más elevadas de los terpenoides ($> 0,1$ mM) generaban inestabilidad en la membrana celular y por dicho motivo no pudieron ser estudiadas.

Se realizaron los controles correspondientes preincubando las células con el vehículo utilizado para los terpenoides. El DMSO no generó una reducción estadísticamente significativa en el pico de las corrientes activadas por GABA o ACh ($95 \pm 6 \%$ pico de corriente con respecto al control para corrientes activadas por ACh).

Mediante estos ensayos se demostró que timol, carvacrol y eugenol actúan como inhibidores de L-AChRs y de receptores UNC-49 presentes en las células musculares de larvas L1 de *C. elegans*.

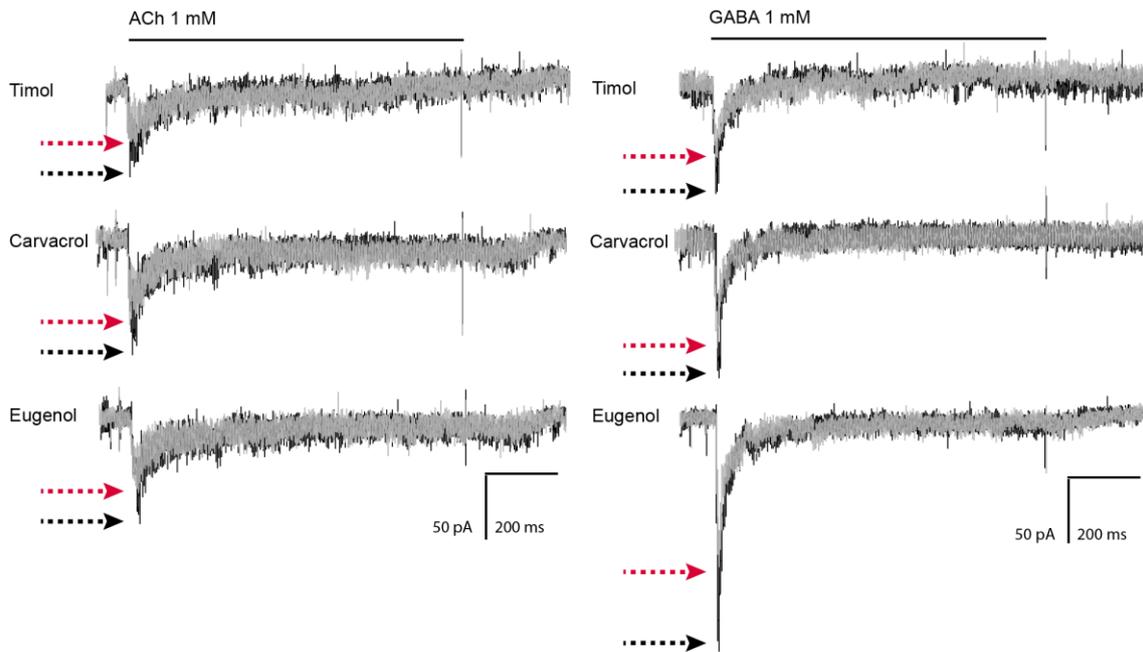


Figura 41: Las corrientes macroscópicas registradas en células musculares de larvas L1 muestran que los terpenoides son inhibidores del L-AChR y del receptor UNC-49. Trazos de corrientes macroscópicas en configuración *whole-cell* registrados en cultivos de células musculares (cepa PD4251) evocadas por un pulso de ACh (izquierda) o GABA (derecha) durante un segundo, en presencia o ausencia de preincubación previa con los terpenoides. Potencial de pipeta: -70 mV. Cada conjunto de corrientes (control y tratada) corresponden a una única célula y cada trazo representa el promedio de 2-4 aplicaciones de agonista tanto en el control como en la condición tratada. Las corrientes activadas por ACh 1 mM o GABA 1 mM fueron registradas antes (trazos negros) y luego de la preincubación durante un minuto con 0,1 mM timol, 0,1 mM carvacrol o 0,1 mM eugenol (trazo gris). La línea negra muestra el tiempo de exposición con agonista. Los picos están indicados con flechas negras (control) y rojas (preincubación con terpenoides).

Los terpenoides disminuyen la actividad de canal único de los L-AChRs generada por ACh y levamisol

Para comprender en mayor detalle la acción de los terpenoides, se registraron corrientes de canal único en configuración *cell-attached* utilizando células musculares de larva L1.

En el Capítulo 1 ya han sido descritos los eventos de canal único de L-AChRs activados por 1-100 μ M de ACh o levamisol en células musculares de larvas L1 (Hernando et al., 2012; Hernando y Bouzat, 2014)(Capítulo 1). Como se describió anteriormente, esta actividad es originada por los L-AChRs y no por los N-AChRs (Rayes et al., 2007; Hernando et al., 2012).

Se aislaron células musculares embrionarias a partir de huevos de *C. elegans* que en cultivo se diferencian a células musculares correspondientes al estadio larval L1. Se utilizó la

cepa PD4251 que contiene GFP en la musculatura. Se realizaron sellos de alta resistencia entre pipetas de vidrio conteniendo en su interior las drogas a testear y las células, y se realizaron registros de canal único.

La actividad de los canales registrada a 100 μM de ACh o levamisol presentó aperturas de $\sim 3,5$ pA ($n = 10$) a 100 mV potencial de pipeta. Estas aparecieron principalmente aisladas o en *bursts* cortos formados por dos o tres eventos de apertura sucesivos (Figura 42), típicos de los canales correspondientes al L-AChR.

Se realizaron registros de canal único colocando en la solución de pipeta los terpenoides junto con ACh 100 μM . Como se ve en la Figura 42, en todos los registros se encontró una reducción en la actividad de canal único con respecto a la condición control realizada solo con ACh. Resultados similares se obtuvieron al colocar en la solución de pipeta levamisol 100 μM y timol 50 μM juntos (Figura 42).

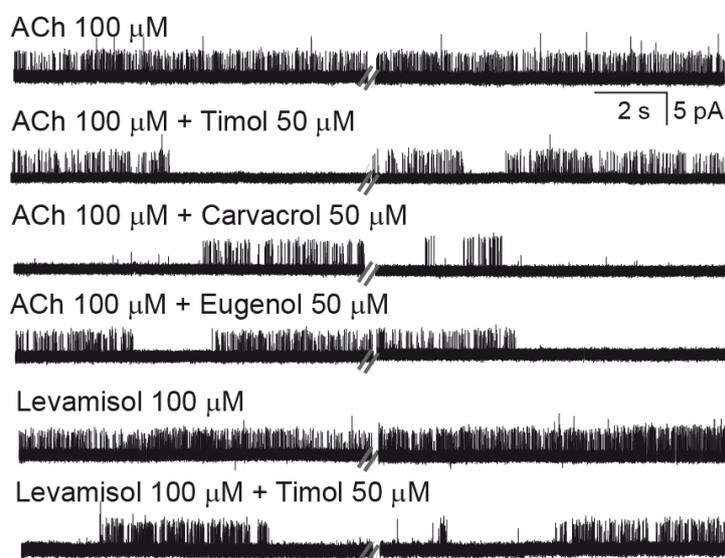


Figura 42: Los terpenoides disminuyen la actividad de canal único de L-AChRs generada por ACh o por levamisol. La actividad de canal único generada por ACh 100 μM o levamisol 100 μM fue registrada en ausencia o presencia de terpenoides a concentración 50 μM en la solución de pipeta. Para cada condición, los dos trazos separados por guiones corresponden al primer (izquierda) y tercer minuto (derecha) de registro. Las aperturas de los canales se muestran como deflexiones hacia arriba. Potencial de pipeta: 100 mV. Filtro: 9 kHz.

Carvacrol 50 μM y eugenol 50 μM también generaron una reducción en la actividad de canal único al ser aplicados junto con ACh 100 μM en comparación con la actividad generada por el agonista ACh 100 μM solo.

Como control, se verificó que el vehículo DMSO 0,1 % no genere ningún cambio en la actividad de canal único ($n = 5$). También se verificó que los terpenoides (1, 50 y 100 μM) no generen actividad de canal único en ausencia de ACh (Figura 43), indicando que no son agonistas y confirmando los resultados obtenidos a partir de las corrientes macroscópicas.

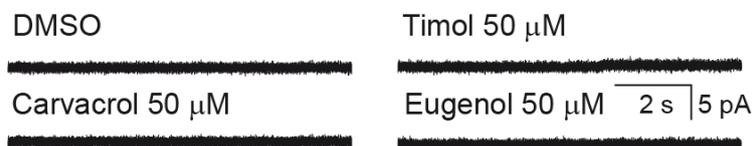


Figura 43: Trazos representativos de la actividad de canal único en presencia de DMSO (vehículo) o de los terpenoides en la solución de pipeta (en ausencia de ACh). Potencial de pipeta: 100 mV. Filtro: 9 kHz.

Los terpenoides no modifican las propiedades del L-AChR activado por ACh pero generan un componente de estado cerrado prolongado

Se analizaron las corrientes de canal único activadas por ACh 100 μM para determinar si los terpenoides afectan las propiedades del L-AChR. La activación con ACh ocurre en eventos aislados o en *bursts* de pocas aperturas sucesivas (Hernando et al., 2012). Los histogramas de estado abierto fueron ajustados con un componente exponencial, y los tiempos medios de estado abierto fueron similares entre la condición control y en presencia de los terpenoides en la solución de pipeta ($\sim 0,2$ ms, Tabla 5 y Figura 44).

Se encontró que la duración media del *burst* ($\sim 0,3$ ms), obtenida de los histogramas de estado abierto construidos con un tiempo crítico de 0,2 ms, no cambió significativamente en presencia de los terpenoides (Tabla 5).

La distribución del tiempo de estado cerrado para L-AChRs en ausencia de terpenoides fue ajustada con dos componentes principales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la duración del componente de cierre más breve en presencia de los terpenoides y en ausencia de los mismos (Tabla 5). Con respecto al segundo componente principal de cierre, hubo una tendencia a duraciones medias de cierre más largas en presencia de los terpenoides. Debido a la variabilidad intrínseca del sistema, se encontraron solo diferencias estadísticamente significativas en presencia de carvacrol 100 μM comparado con la condición control ($p = 0,01$, Tabla 5).

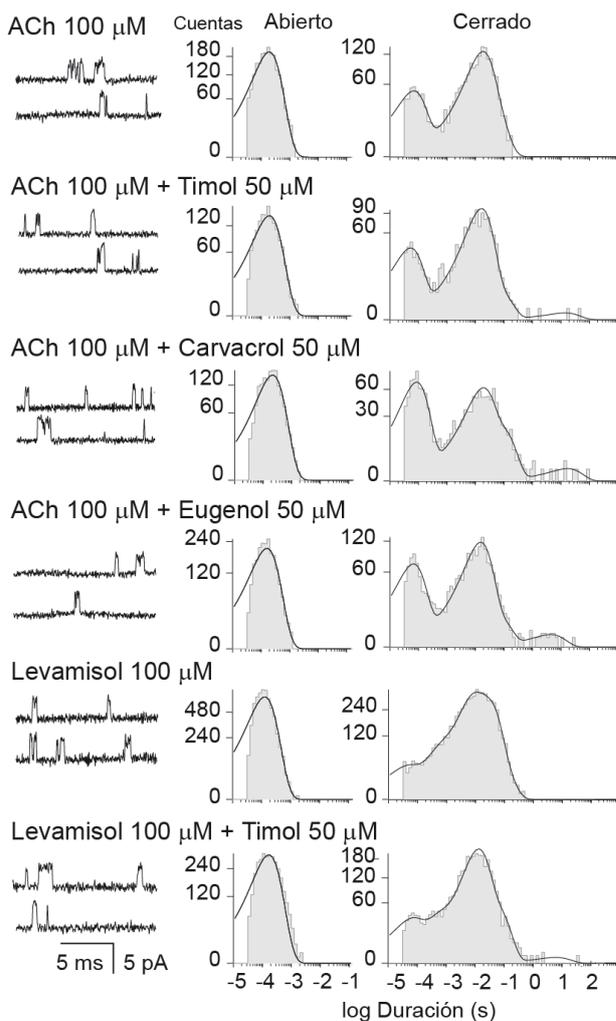


Figura 44: Trazos representativos e histogramas del tiempo de estado abierto y cerrado de los canales. Para cada condición, los trazos superiores corresponden al primer minuto de registro y los inferiores al tercer minuto de registro. Potencial de pipeta: 100 mV. Filtro: 9 kHz.

Llamativamente, un nuevo componente de cierre de mayor duración estaba presente en todos los registros en presencia de los terpenoides (Figura 44), indicando la existencia de tiempos de estado cerrado de permanencia prolongada con respecto a los registros control. La duración de este nuevo componente fue variable entre diferentes parches. Sin embargo, la duración media de este componente de cierre aumentó de $7,1 \pm 3,9$ a $23,9 \pm 12$ segundos cuando la concentración de timol aumentó de 1 a $100 \mu\text{M}$ ($p = 0,03$), y de $3,9 \pm 1,7$ a $7,9 \pm 2,5$ segundos para 1 y $100 \mu\text{M}$ de carvacrol, respectivamente ($p = 0,046$), indicando un efecto dependiente de la concentración.

Agonista	Tratamiento	$O_1(\text{ms})$ (área)	$C_1(\text{ms})$ (área)	$C_2(\text{ms})$ (área)	Burst (ms)	n
ACh	DMSO control	$0,21 \pm 0,02$ (1 ± 0)	$0,06 \pm 0,01$ ($0,28 \pm 0,03$)	$19,2 \pm 3,11$ ($0,71 \pm 0,02$)	$0,30 \pm 0,03$	6

100 μM	Timol 1 μ M	0,21 \pm 0,02 (1 \pm 0)	0,08 \pm 0,004 (0,55 \pm 0,04)	18,67 \pm 6,43 (0,39 \pm 0,014)	0,46 \pm 0,07	5
	Carvacrol 1 μ M	0,20 \pm 0,03 (1 \pm 0)	0,08 \pm 0,008 (0,48 \pm 0,09)	23 \pm 1,73 (0,48 \pm 0,06)	0,39 \pm 0,11	5
	Eugenol 1 μ M	0,24 \pm 0,05 (1 \pm 0)	0,07 \pm 0,014 (0,46 \pm 0,15)	16,03 \pm 7,84 (0,49 \pm 0,08)	0,55 \pm 0,19	5
	Timol 50 μ M	0,18 \pm 0,02 (1 \pm 0)	0,07 \pm 0,01 (0,24 \pm 0,04)	18,6 \pm 3,32 (0,61 \pm 0,11)	0,24 \pm 0,03	5
	Carvacrol 50 μ M	0,20 \pm 0,01 (1 \pm 0)	0,09 \pm 0,004 (0,39 \pm 0,08)	23 \pm 5,20 (0,54 \pm 0,13)	0,36 \pm 0,05	5
	Eugenol 50 μ M	0,15 \pm 0,005 (1 \pm 0)	0,07 \pm 0,01 (0,35 \pm 0,04)	17,95 \pm 4,13 (0,62 \pm 0,05)	0,24 \pm 0,02	5
	Timol 100 μ M	0,27 \pm 0,06 (1 \pm 0)	0,06 \pm 0,01 (0,35 \pm 0,11)	32,14 \pm 21,02 (0,59 \pm 0,11)	0,43 \pm 0,13	7
	Carvacrol 100 μ M	0,21 \pm 0,05 (1 \pm 0)	0,07 \pm 0,008 (0,35 \pm 0,15)	31,53 \pm 10,65 (0,49 \pm 0,11)	0,34 \pm 0,15	5
Levamisol 100 μM	DMSO control	0,25 \pm 0,08 (1 \pm 0)	0,05 \pm 0,03 (0,1 \pm 0,05)	55,2 \pm 19,96 (0,47 \pm 0,11)	0,27 \pm 0,1	5
	Timol 50 μ M	0,33 \pm 0,15 (1 \pm 0)	0,07 \pm 0,02 (0,15 \pm 0,14)	106 \pm 83 (0,64 \pm 0,24)	0,45 \pm 0,31	5
ACh 10 μM	DMSO control	0,31 \pm 0,06 (1 \pm 0)	0,05 \pm 0,02 (0,22 \pm 0,16)	43,75 \pm 23,98 (0,73 \pm 0,16)	0,52 \pm 0,35	6
	Timol 50 μ M	0,30 \pm 0,07 (1 \pm 0)	0,07 \pm 0,01 (0,15 \pm 0,09)	48,17 \pm 18,34 (0,77 \pm 0,1)	0,39 \pm 0,13	7

Tabla 5: Registros de canal único realizados en células musculares L1 a un potencial de pipeta de 100 mV. Los canales de ACh corresponden a L-AChRs registrados en presencia de ACh o levamisol con o sin los terpenoides en la solución de pipeta. La duración media del componente de estado abierto (O_1), de estado cerrado (C_1 y C_2) y la duración media del *burst* fueron obtenidos de los correspondientes histogramas. Los datos se muestran como la media \pm desvío estándar y el número de registros para cada condición se indica con la letra n.

Timol no afecta la conductancia de canal único del L-AChR activado por ACh

Las relaciones entre las amplitudes de los canales y los diferentes potenciales de pipeta empleados, revelaron que los L-AChRs activados por ACh en presencia de timol exhibe una conductancia de $32 \pm 0,9$ pSs, similar a la observada en su ausencia, $33 \pm 0,9$ pSs, $p = 0,12$. Por

lo tanto, la disminución en la amplitud de las corrientes macroscópicas no puede ser atribuida a una disminución de la amplitud en canal único.

Los terpenoides generan una reducción en la frecuencia de aperturas del L-AChR

El principal cambio en el patrón de actividad del L-AChR debido a la presencia de los terpenoides fue la reducción en la frecuencia de aperturas del canal demostrado por la detección de tiempos de cierre prolongados. Como se observa en la Figura 42, dicho cambio fue claramente detectado mediante inspección visual de los registros. En presencia de ACh o levamisol 100 μM , el número de eventos permaneció constante durante el curso del registro (Figura 42)(Hernando et al., 2012). Sin embargo, con la incorporación de los terpenoides (1, 50 o 100 μM), el patrón de actividad del canal se caracterizó por la presencia de períodos activos alternados con períodos sin actividad. Cambios similares fueron detectados para levamisol 100 μM en presencia de timol 50 μM (Figura 42).

Para cuantificar la disminución en la frecuencia de aperturas del canal, se contabilizó el número de eventos de apertura en 3-5 minutos de registro. Se comparó el número de aperturas por minuto en presencia de los terpenoides con registros controles en ausencia de los compuestos (Figura 45).

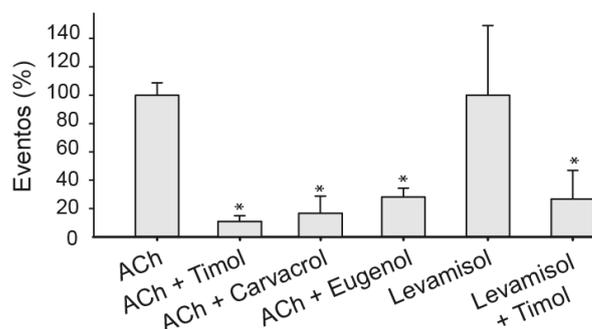


Figura 45: El gráfico de barras muestra el porcentaje de eventos de aperturas \pm desvío estándar en un minuto de registro en las diferentes condiciones. El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control correspondiente (ACh o levamisol). * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

Como se muestra en la Figura 45, los terpenoides ejercieron una marcada disminución, estadísticamente significativa, en el número de eventos de apertura que no fue dependiente del tipo de agonista.

Timol no actúa como un antagonista competitivo del L-AChR

La actividad de canal único a bajas concentraciones de ACh (10 μM) ocurrió en aperturas aisladas o en *bursts* cortos correspondientes a aperturas sucesivas. Los histogramas de tiempo de estado abierto de L-AChRs activados por ACh 10 μM en presencia de timol 50 μM fueron

ajustados con un componente exponencial cuya duración media fue similar a la de la condición control (Tabla 5). La duración media del *burst* también fue similar en ambas condiciones (Tabla 5), indicando que no cambian las duraciones por acción del timol y confirmando que la frecuencia de apertura es el principal parámetro afectado.

Para determinar si timol puede actuar como antagonista competitivo, se estudió la disminución en la frecuencia de aperturas ante la presencia de timol 50 μM sobre receptores activados a dos concentraciones de ACh diferentes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la disminución en la frecuencia de aperturas debido a la presencia de timol 50 μM en registros de canales activados por ACh 10 μM o 100 μM . El porcentaje de eventos de apertura respecto a la condición sin timol fue $42 \pm 24\%$ a ACh 10 μM , $n = 7$, y $19 \pm 9\%$ a ACh 100 μM ($n = 5$, $p > 0,3$). Estos resultados sugieren que timol no actúa como un antagonista competitivo dado que el aumento de 10 veces la concentración de ACh no desplazó el efecto de timol.

En general, en presencia de los tres terpenoides timol, carvacrol y eugenol, la actividad de canal único de L-AChRs se redujo significativamente, indicando un efecto inhibitorio. Los resultados son compatibles con la acción de estas drogas como inhibidores alostéricos.

Los terpenoides estudiados en este Capítulo emergen como potenciales compuestos antihelmínticos interactuando mediante dos tipos de receptores *Cys-loop* con acción antagonista en la unión neuromuscular del nematodo. Se plantea su uso como una alternativa o como una estrategia antihelmíntica complementaria para superar la creciente resistencia de parásitos a las drogas antihelmínticas clásicas.

Los ensayos de este Capítulo fueron realizados en conjunto con la Dra. Guillermina Hernando.

Discusión

Las plantas son una fuente alternativa y atractiva de compuestos antihelmínticos botánicos, de nuevas entidades químicas. Producen aceites esenciales como productos orgánicos del metabolismo secundario. El efecto de estos aceites está asociado a sus biocompuestos que actúan en sinergismo e interactúan con múltiples blancos moleculares presentes en los nematodos, interfiriendo con sus funciones bioquímicas y fisiológicas (André et al., 2017).

C. elegans, el sistema modelo de nematodos parásito, ha contribuido de manera importante al descubrimiento de drogas antihelmínticas, al entendimiento de sus modos de acción y de los mecanismos asociados a la resistencia (Holden-Dye y Walker, 2007; Geary et al., 2015). Por este motivo, se definió la acción antihelmíntica de tres terpenoides presentes en especies vegetales sobre patrones de comportamiento de *C. elegans*: timol, el componente principal del tomillo (*Thymus vulgaris*), carvacrol, el compuesto principal del orégano (*Origanum vulgare*) y eugenol presente en el clavo (*Syzygium aromaticum*). También se determinaron los blancos moleculares asociados a los efectos paralizantes de los terpenoides y se describió el mecanismo molecular implicado.

A principio de 1900, el timol, ya era utilizado para el tratamiento de ascariasis y anquilostomas en humanos sin que, por supuesto, se conocieran las bases moleculares de dicho efecto (Ferrell, 1914; Lamson y Ward, 1932). Existen algunos reportes más recientes que muestran la acción de timol y carvacrol como drogas antiparasitarias mediante estudios *in vivo* e *in vitro* en nematodos parásitos (Kaplan et al., 2014). Por ejemplo, ambas drogas demostraron tener actividad nematocida *in vitro* en *A. suum* (Abdel-Rahman et al., 2013), y carvacrol presenta actividad nematocida sobre *H. contortus* (Andre et al., 2016) además de actuar *in vitro* sobre las larvas L3 de *Anisakis simplex*, generando modificaciones en su cutícula y en el intestino (Hierro et al., 2004).

Un solo trabajo, en el cual se testearon varios fitoterpenoides, había demostrado la potencial actividad nematocida de eugenol, carvacrol y timol sobre *C. elegans*. Estos resultados se obtuvieron incubando nematodos, en estadio L1-L3, con los compuestos durante 24 horas en placas *multiwells*. Luego los nematodos fueron transferidos a *buffer* M9 durante 24 horas, y al finalizar el periodo de incubación se registró el número de nematodos muertos bajo estereomicroscopio (Abdel-Rahman et al., 2013).

Los resultados desarrollados en este Capítulo confirman las propiedades antihelmínticas de los terpenoides, pero además aportan nueva información de importancia para sus usos

terapéuticos: dilucidan sus sitios y mecanismos de acción molecular, describen el tipo de parálisis generado y establecen sus efectos al combinarse con antiparasitarios clásicos, siendo esto de relevancia para la aplicación en terapias antihelmínticas combinadas.

En este Capítulo se encontró que los terpenoides inducen parálisis en nematodos *C. elegans* salvajes en función tanto del tiempo de exposición como de la concentración de la droga utilizada. El orden de potencia establecido para los efectos paralizantes de cada droga, según el valor EC_{50} , fue: carvacrol > timol > eugenol, en concordancia con previos reportes realizados en *H. contortus* y *C. elegans* (Abdel-Rahman et al., 2013; Andre et al., 2016; André et al., 2017; Katiki et al., 2017).

La parálisis muscular generada por agonistas del L-AChR, como por ejemplo levamisol, es de tipo espástica debido a que la activación de estos receptores nicotínicos interviene en la contracción muscular (Holden-Dye y Walker, 2014; Blanchard et al., 2018). El fenotipo corporal se caracteriza por la contracción de los músculos que genera en consecuencia individuos con una longitud corporal acortada. Los agonistas del receptor UNC-49, GABA miméticos como la piperazina, generan parálisis flácida de los músculos de la pared del cuerpo (Holden-Dye y Walker, 2014). En este fenotipo corporal se pierde el tono muscular y el animal no puede controlar activamente la forma de su cuerpo (Herndon et al., 2010).

Mediante inspección en un microscopio estereoscópico con zoom y medición de la longitud relativa del cuerpo de los nematodos, se determinó que los terpenoides producen parálisis “isométrica” dado que la longitud corporal de los nematodos no cambió significativamente durante la exposición a los terpenoides en placas de agar.

Los compuestos derivados de especies vegetales podrían tener múltiples sitios de acción antiparasitaria (Trailović et al., 2015). El tipo de cambio fenotípico inducido por los terpenoides podría deberse a sus efectos duales sobre los receptores musculares que median acciones antagonistas: los L-AChRs involucrados en la contracción muscular y los receptores UNC-49 en la relajación de los mismos.

Para confirmar la participación de dichos receptores en la actividad antihelmíntica de los terpenoides se realizaron ensayos de parálisis en placas, y se encontró que los mutantes que carecían de los L-AChR y receptores de GABA eran parcialmente resistentes a los terpenoides. Con ello se concluyó que los principales receptores asociados a la locomoción en *C. elegans* son los blancos moleculares de los terpenoides.

En los ensayos de comportamiento se vio, solo a concentraciones bajas, que los mutantes que carecen del receptor ACR-16 son más resistentes a los terpenoides que los nematodos salvajes. Por lo tanto, se concluyó que los N-AChRs también podrían participar en la acción antihelmíntica de los terpenoides. Llamativamente, en el parásito *Ancylostoma caninum* (clado V) que afecta a perros, el receptor ACR-16 ha sido propuesto como un posible blanco molecular para el desarrollo de antihelmínticos contra infecciones causadas por anquilostomas (Choudhary et al., 2019). El nAChR ACR-16 de *A. suum* y *Parascaris equorum*, ambos parásitos pertenecientes al clado III, también han sido reportados como posibles blancos para drogas antihelmínticas en desarrollo (Abongwa et al., 2016; Charvet et al., 2018).

Aunque es posible asegurar que los receptores L-AChR y UNC-49 están marcadamente involucrados en los efectos paralizantes de los terpenoides y que los N-AChRs también podrían participar, otros blancos moleculares adicionales aquí no explorados, no pueden ser descartados. Por ejemplo, carvacrol y timol, podrían interactuar con SER-2, un receptor de tiramina presente en *C. elegans* (Lei et al., 2010), que es el blanco molecular de timol y carvacrol en *Drosophila melanogaster* (Enan, 2005). Carvacrol también se une a receptores de GABA y tiramina en insectos generando un efecto inhibitorio (Tong y Coats, 2012; Tong et al., 2013).

Además, si bien en este Capítulo solo se determinó el efecto de los terpenoides sobre los receptores nicotínicos tipo L y N, *C. elegans* contiene 29 subunidades que integran diversos nAChRs, los cuales podrían ser estudiados para comprender la selectividad de los terpenoides en la familia de receptores nicotínicos.

Por otro lado, los terpenoides actúan sobre receptores pertenecientes a otras familias, como los receptores de potencial transitorio (*transient receptor potential*, TRP). El TRPV3 expresa en piel, lengua y nariz, y es fuertemente activado y sensibilizado por carvacrol, timol y eugenol. Dichos canales iónicos permeables a cationes serían los blancos moleculares asociados al sabor y a la sensibilidad en la piel de los derivados de las plantas orégano, tomillo y clavo (Xu et al., 2006). Canales de esta familia (*transient receptor potential cation*, TRPC) también están presentes en *C. elegans* (Yeon et al., 2018) y por lo tanto podrían intervenir en los efectos de estos terpenoides sobre el nematodo.

Se determinó que la sensibilidad a los terpenoides varía entre los diferentes estadios de desarrollo de *C. elegans*, y que las larvas L1 son más sensibles que los nematodos adultos. Estos descubrimientos son relevantes debido a la importancia que tiene el estadio larval en la transmisión de infecciones de nematodos parásitos. Una posible explicación para la diferente sensibilidad a los terpenoides podría ser la diferencia en la permeabilidad de las cutículas entre

larvas L1 y nematodos adultos (Politz y Philipp, 1992; Page et al., 2014). En cada estadio larval, una nueva cutícula es generada y la vieja es removida permitiendo el crecimiento del organismo. Las cutículas correspondientes a cada estadio de desarrollo difieren en la expresión de proteínas, en el número de capas que la componen, en el espesor y la composición, posiblemente en función de sus necesidades y de las condiciones ambientales (Lints y Hall, 2009). La cutícula de un nematodo adulto tiene un espesor aproximado de 0,5 μm (Cox et al., 1981a) y se organiza en cinco capas principales: la capa superficial, la epicutícula y las zonas cortical, basal y medial (Cox et al., 1981a; Bird y Bird, 1991). Con el envejecimiento del organismo el espesor de la cutícula aumenta debido a la expansión de la zona basal (Herndon et al., 2002). Por lo tanto, las cutículas de los diferentes estadios larvales difieren de la de los adultos en el tipo de capas presentes y en sus espesores relativos.

La capacidad de poder detectar confiablemente resistencia a antihelmínticos es un aspecto crucial en el manejo de la resistencia (Von Samson-Himmelstjerna et al., 2009). La implementación exitosa de programas destinados a limitar el desarrollo de resistencia en poblaciones de nematodos parásitos depende de la disponibilidad de métodos sensibles para su detección y monitoreo. El ensayo de eclosión de huevos ha sido utilizado para detectar resistencia a drogas (Taylor et al., 2002). Además de los efectos paralizantes rápidos de los terpenoides mediados por los receptores L-AChR y UNC-49 en la unión neuromuscular, se encontró que timol, carvacrol y eugenol incrementan la fracción de huevos sin eclosionar. Así, la inhibición irreversible de la eclosión de los huevos de *C. elegans* conduciría a una actividad antihelmíntica de mayor espectro. El modo de acción mediante el cual los terpenoides generan dicha inhibición, aún no ha sido determinado. Sin embargo, en reportes previos de otros autores, se han brindado posibles hipótesis que explicarían como el timol afecta la eclosión de los huevos de *H. contortus*. Dicho compuesto podría evitar cambios en la permeabilidad de la cubierta de los huevos al unirse a lipoproteínas, inhibir la activación de enzimas asociadas a la eclosión del huevo o unirse de manera competitiva a factores de eclosión en la cubierta de los huevos y alterar en consecuencia el proceso de eclosión (André et al., 2017).

Los resultados obtenidos indican que, mediante dos mecanismos diferentes, parálisis rápida e inhibición de la eclosión de huevos, los terpenoides podrían tener una actividad antihelmíntica potente y prolongada en el tiempo. Descubrimientos similares han sido reportados al exponer al nematodo parásito *H. contortus* a timol (André et al., 2017), carvacrol (André et al., 2016) y eugenol (Katiki et al., 2017), donde se observaron efectos ovicidas, larvicidas y adulticidas.

El uso de agentes quimioterapéuticos combinados es una estrategia eficaz que permite reducir la toxicidad y el desarrollo de resistencia. Ha sido utilizada para tratar muchas enfermedades como cáncer e infecciones bacterianas y virales. Esta estrategia también es útil para tratar parasitosis, por ejemplo, en rumiantes combinaciones nematicidas pueden ser utilizadas para retrasar el desarrollo de resistencia en los parásitos (Lanusse et al., 2018).

El fundamento del uso de combinaciones de drogas se basa en que cada parásito individualmente podría tener un bajo grado de resistencia a una fórmula con múltiples componentes (cada compuesto con un modo de acción/resistencia diferente) en comparación al uso de moléculas antihelmínticas simples (Lanusse et al., 2018).

El uso de fitoquímicos bioactivos combinados con compuestos sintéticos ha mostrado resultados prometedores en el control de hongos, bacterias y ácaros. Sin embargo, la información sobre la actividad nematicida de monoterpenos en combinación con otros compuestos naturales o sintéticos es limitada (Lanusse et al., 2018). Ante este panorama, en este Capítulo se estudió la combinación de timol con antihelmínticos clásicos, y se evaluó cuidadosamente sus efectos ya que la susceptibilidad de los nematodos podría cambiar con respecto a los efectos de drogas individuales. En las concentraciones testeadas, la combinación de timol y levamisol fue más efectiva en paralizar a los nematodos en comparación con el timol solo. Las combinaciones de timol con piperazina y de timol con ivermectina fueron menos efectivas en comparación con el timol solo.

Mediante el teorema de Chou-Talalay's incluido en el *software Compusyn* se determinó que, en las concentraciones testeadas, el efecto de la combinación de timol y levamisol es sinérgico ($CI < 1$). El sinergismo entre monoterpenos y antihelmínticos ya ha sido sugerido previamente por otros autores (Trailović et al., 2015). Este es el efecto superior observado mediante la combinación de sustancias en relación a los efectos de los compuestos aislados con el objetivo de mejorar los efectos terapéuticos, reducir las dosis y efectos secundarios (Williamson, 2001). Es decir, mediante la interacción farmacológica de timol y levamisol, al ser administradas simultáneamente, una de las drogas mejora la intensidad de los efectos farmacológicos de la otra.

Para poder definir y comprender la acción de los terpenoides en mayor detalle, se realizaron registros electrofisiológicos utilizando células musculares L1 de *C. elegans*. Mediante corrientes macroscópicas en configuración *whole-cell* se midieron por un lado las respuestas de L-AChRs y receptores UNC-49 a los terpenoides, y por otro lado las respuestas de sus agonistas endógenos antes y después de la aplicación de terpenoides. Desafortunadamente, y como fue

reportado previamente, estos cultivos primarios de células musculares no son técnicamente adecuados para aplicación sucesiva de drogas, y por lo tanto no es posible obtener una caracterización farmacológica completa (Hernando et al., 2012; Hernando y Bouzat, 2014). Se sabe que el timol afecta ciertas propiedades de la membrana plasmática celular, como por ejemplo la estabilidad (Singh, 1980; Manabe et al., 1987). Debido a la inestabilidad generada por los terpenoides en los parches realizados sobre la membrana celular, no pudieron testarse altas concentraciones de las drogas. De todas formas, mediante estos estudios se reveló que los terpenoides no son capaces de activar los L-AChR y receptores UNC-49, y que los picos de las corrientes evocadas por los agonistas ACh y GABA se reducen luego de la preincubación con timol, carvacrol o eugenol, indicando que los terpenoides actúan como inhibidores de los receptores L-ACh y UNC-49 de *C. elegans*.

Para estudiar en mayor detalle los mecanismos asociados al efecto inhibitorio observado en las corrientes macroscópicas, se registraron corrientes de canal único activadas por ACh y levamisol. Previamente se demostró que las corrientes generadas por ACh y levamisol corresponden al L-AChR (Hernando et al., 2012). El análisis reveló cambios en el patrón de actividad de los canales, sin embargo, no hubo cambios en la amplitud, en la duración media de estado abierto del canal ni en la duración de los *bursts*.

El principal cambio que se observó fue una marcada reducción en la frecuencia de aperturas del L-AChR, lo cual explica las bases mecánicas de su efecto inhibitorio. Este efecto podría deberse a la acción de los terpenoides como antagonistas competitivos o como inhibidores alostéricos negativos de L-AChRs. Sin embargo, como la disminución en la frecuencia de aperturas fue similar a la generada por una concentración de ACh 10 veces mayor (10 y 100 μM), los resultados sugieren que los terpenoides son inhibidores alostéricos no competitivos. Los mecanismos moleculares subyacentes a la inhibición no competitiva podrían ser un aumento en la desensibilización de receptores en reposo, un bloqueo lento de canal abierto o apertura del canal disminuida. Sin embargo, estos mecanismos no pueden ser distinguidos mediante los registros de canal único realizados.

Por lo tanto, se demostró que los terpenoides generan una inhibición alostérica de la respuesta de L-AChRs generada por ACh en las células musculares de *C. elegans*. Resulta interesante que estudios realizados en *A. suum* demostraron que carvacrol inhibe la contracción muscular y la despolarización de la membrana celular inducida por ACh, lo cual explicaría sus propiedades antiparasitarias (Trailović et al., 2015). Esta observación está en concordancia con

los hallazgos en *C. elegans* y así permite validar al nematodo de vida libre como un nematodo modelo para descifrar la acción de los terpenoides.

Se ha visto que los terpenoides actúan como moduladores alostéricos tanto positivos como negativos en una gran variedad de receptores *Cys-loop*. Por ejemplo, timol es un modulador alostérico positivo del receptor humano GABA_A y del receptor de GABA RDL_{ac} homomérico presente en *Drosophila melanogaster*. Genera una potenciación dosis-dependiente de la respuesta de GABA en ovocitos inyectados con las subunidades de GABA humano o de RDL_{ac} (Priestley et al., 2003). La sustitución de una treonina por una metionina en la posición 6 de la hélice M2 del receptor RDL de *Drosophila*, imitando de esta forma al receptor RDL del ácaro *Varroa destructor*, convierte a timol en un modulador negativo (Price y Lummis, 2014). También existen evidencias de que carvacrol es modulador alostérico positivo de receptores de GABA de invertebrados y de mamíferos (Priestley et al., 2003; Reiner et al., 2013).

Tanto timol como carvacrol exhiben actividad agonista alostérica en el receptor humano 5-HT_{3A} interactuando con sitios transmembrana. A concentraciones bajas en las cuales los efectos agonistas son menos evidentes, estos terpenoides actúan como potenciadores de las respuestas evocadas por el agonista 5-HT. Tanto la activación como la potenciación de timol y carvacrol sobre 5-HT_{3A} son especie selectivas, se llevan a cabo en el receptor humano, pero no en el de ratón (Lansdell et al., 2015).

Timol también es capaz de inhibir las corrientes macroscópicas generadas por el receptor de glutamato permeable a cloruro (GluCl) presente en los parásitos *Schistosoma mansoni* (SmGluCl-2) y *Haemonchus contortus* (AVR-14B GluCl). Los GluCls presentes tanto en gusanos planos como redondos contienen una cavidad transmembranal a la que se unen los monoterpenoides e inhiben la activación del canal, generada por L-glutamato (Lynagh et al., 2014). En los ensayos de comportamiento realizados en este Capítulo, la cepa triple mutante en el receptor de glutamato permeable a cloruro, que es resistente a IVM, fue sensible a timol. Esto podría indicar que, para la acción antihelmíntica de timol, los efectos a través de los L-AChR y receptores de GABA son dominantes, o que los GluCls de *C. elegans* no son sensibles.

Los monoterpenos cíclicos, incluidos timol y carvacrol, inhiben directamente la función de $\alpha 7$ nAChR actuando como moduladores alostéricos negativos (Lozon et al., 2016). Estudios de *docking* usando una estructura NMR del dominio transmembrana del nAChR humano $\alpha 7$ (PDB código 2MAW) (Bondarenko et al., 2014), indican que los monoterpenos cíclicos podrían interactuar con un sitio alostérico situado en el dominio transmembrana (Lozon et al., 2016). Los autores sugieren que la unión de ligandos como los monoterpenos a la conformación

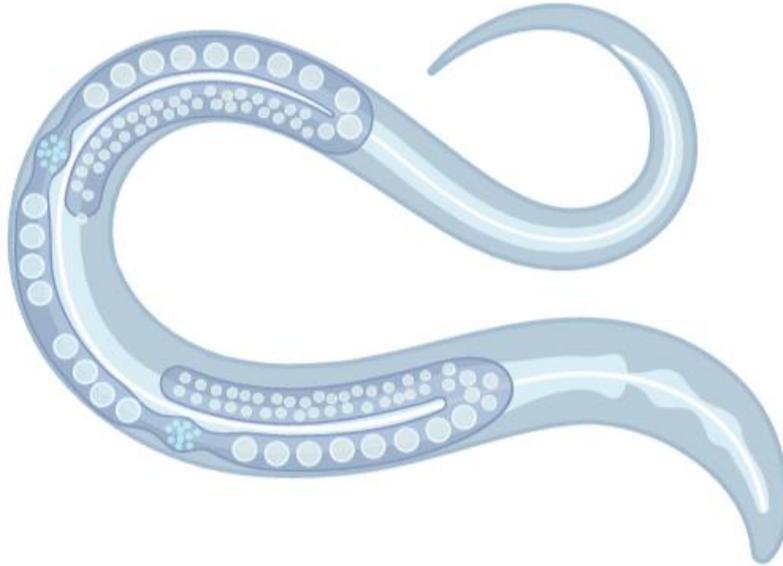
cerrada del canal podría prevenir que la hélice M2 adopte la orientación característica de canal abierto (Lozon et al., 2016). La acción de timol a través del dominio transmembrana está en concordancia con los resultados obtenidos en mutantes del receptor RDL de *Varroa destructor* indicando que el segmento M2 está involucrado en la modulación del timol (Price y Lummis, 2014). Esta interpretación se corresponde con los resultados obtenidos en los registros de canal único de este Capítulo: en presencia de los agonistas ACh o levamisol, los terpenoides generan una reducción en la frecuencia de eventos de apertura de L-AChRs.

La interacción de los terpenoides con diferentes receptores presentes en los nematodos, muestra importantes ventajas. Diversas investigaciones indican que los agentes polifarmacológicos, es decir aquellos que actúan simultáneamente en varios blancos moleculares, tendrían mejores perfiles con respecto a la eficacia y a los efectos secundarios, en comparación con ligandos selectivos (Iturriaga-Vásquez et al., 2015).

Los compuestos pueden actuar no solo a través de los sitios de unión ortostéricos de un receptor, sino que también pueden modularlos mediante la unión a sitios alostéricos. Los nAChRs poseen múltiples sitios de unión lo cual ofrece una posibilidad interesante para el desarrollo de agentes farmacológicos con amplio espectro de acción. Los sitios alostéricos están presentes tanto en el dominio extracelular como en el dominio transmembrana, y los residuos que los forman son variados tanto en tamaño como en propiedades fisicoquímicas, generando un enorme potencial polifarmacológico (Iturriaga-Vásquez et al., 2015).

Además, al actuar en diferentes receptores, los terpenoides podrían reducir o retrasar el desarrollo de resistencia. La resistencia a una droga se genera, entre otras cosas, por la pérdida de sensibilidad en un tipo de receptor específico a esa droga. Pero los terpenoides, al actuar en múltiples blancos moleculares, podrían continuar teniendo efecto sobre otros receptores que no perdieron la sensibilidad.

Ante la creciente resistencia a las drogas antihelmínticas de uso común en parásitos, el tratamiento con terpenoides podría ser una alternativa o una estrategia antihelmíntica complementaria para solucionar dicha problemática. Además, estos compuestos presentes en especies vegetales podrían ser utilizados como suplemento para reducir la carga de infecciones de helmintos transmitidos por el suelo, de una manera eficaz, segura y a un bajo costo.



CAPÍTULO III

**UN NUEVO ANTAGONISTA DE LOS CANALES DE CLORURO
ACTIVADOS POR GLUTAMATO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*
CON ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA**

CAPÍTULO III: UN NUEVO ANTAGONISTA DE LOS CANALES DE CLORURO ACTIVADOS POR GLUTAMATO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* CON ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA**Introducción:**

A diferencia de los vertebrados, los invertebrados contienen una gran variedad de receptores *Cys-loop*, incluyendo un tipo único de canales de cloruro activados por glutamato (GluCl_s) (Jones y Sattelle, 2008; Lynagh y Lynch, 2012). Los GluCl_s son miembros de la superfamilia de canales iónicos activados por ligandos o neurotransmisores (LGICs) (Trailović et al., 2015) y se relacionan con el receptor de glicina de mamíferos (GlyR) y el receptor de GABA tipo A (GABA_AR) (Wolstenholme, 2012; Lynagh et al., 2014). La relación evolutiva cercana entre GluCl_s y receptores de glicina podría explicarse por la capacidad del glutamato de potenciar las corrientes del receptor de glicina (Wolstenholme, 2012). A nivel de aminoácidos, las subunidades de GluCl_s de *C. elegans* clonadas hasta el momento presentan un 40 % de identidad con subunidades del receptor de glicina y un 30-35 % de identidad con las subunidades de receptores de mamífero GABA_A y GABA_C (Horoszok et al., 2001; Hibbs y Gouaux, 2011).

A diferencia de los receptores de GABA, nAChRs, canales de calcio y potasio de nematodos parásitos, que presentan homólogos en mamíferos, los GluCl_s parecieran no tener homólogos en especies hospedadoras. Esta característica es atractiva cuando se los consideran sitios de unión para antihelmínticos en desarrollo (Robertson y Martin, 2007). Existen ciertas diferencias entre GluCl_s de invertebrados y los receptores de glicina y GABA_A de mamíferos, particularmente en el sitio de unión. Esto da lugar al desarrollo de agonistas de GluCl_s con selectividad para invertebrados sin afectar receptores de mamíferos (Lynagh et al., 2014).

C. elegans posee 102 genes que codifican subunidades que integran canales iónicos *Cys-loop* activados por ligandos. Estas subunidades, además de formar canales permeables a cationes, integran canales permeables a aniones activados por ACh, GABA, serotonina y glutamato (Brown et al., 2006; Jones y Sattelle, 2008). Los receptores de glutamato ionotrópicos excitatorios e inhibitorios están asociados a circuitos neurales y al comportamiento del nematodo. Los GluCl_s inhibitorios permeables a cloruro son de gran relevancia porque al ser sensibles a las avermectinas son los blancos del antiparasitario más utilizado, la ivermectina (Brockie y Maricq, 2006).

Existen al menos seis genes que codifican subunidades de GluCl_s en *C. elegans*: *glc-1*, *glc-2*, *glc-3*, *glc-4*, *avr-14* y *avr-15* (Cully et al., 1994; Cully et al., 1996; Vassilatis et al., 1997; Dent et al., 2000; Horoszok et al., 2001). El gran número de subunidades de receptores identificadas sugiere que el nematodo tiene la capacidad de expresar un número diverso de GluCl_s

funcionales (Brockie y Maricq, 2006). La distribución celular de subunidades de GluCl α s de *C. elegans* ha sido descripta utilizando la molécula reportera GFP, sin embargo, los arreglos estequiométricos aún no han sido esclarecidos. Estos receptores se expresan principalmente en células musculares de la faringe, músculo del cuerpo y en neuronas (Brockie y Maricq, 2006).

Gen	Subunidad	Lugar de expresión	Función
<i>avr-14</i>	GluCl α 3A y GluCl α 3B	Neuronas motoras, sensoriales e interneuronas.	Junto con <i>avr-15</i> median la inhibición mecanosensorial del bombeo faríngeo. Sensibilidad a IVM.
<i>avr-15</i>	GluCl α 2A y GluCl α 2B	Neuronas de la cabeza, cordones nerviosos sublaterales y algunas neuronas mecanosensoriales. Músculo de la faringe (pm4 y pm5).	Junto con <i>avr-14</i> median la inhibición mecanosensorial del bombeo faríngeo. Media relajación de faringe. Sensibilidad a IVM.
<i>glc-1</i>	GluCl α 1	Intestino, músculos de la faringe y de la pared del cuerpo, neuronas de la cabeza.	Sensibilidad a IVM.
<i>glc-2</i>	GluCl β	Células pm4 musculares de la faringe.	Media relajación de la faringe.
<i>glc-3</i>	GluCl α 4	Interneuronas AIY.	Regula respuestas a olores y temperaturas.
<i>glc-4</i>	No descripta.	Intestino, músculo depresor anal, células de la cabeza mesodermales, anillo nervioso, neuronas de cabeza y cola.	No descripta.

Tabla 6: Genes de *C. elegans* que codifican para subunidades que conforman los subtipos GluCl α s. Lugar de expresión de cada subunidad y su función (Brockie y Maricq, 2006; Wolstenholme, 2012; Holden-Dye y Walker, 2014).

Los GluCl α s presentes en invertebrados controlan y modulan la locomoción, y regulan las respuestas sensoriales olfatorias y de temperatura. En nematodos, controlan el bombeo faríngeo que es requerido para la alimentación y el mantenimiento de la presión hidrostática (Jones y Sattelle, 2008; Wolstenholme, 2012). La motoneurona glutamatérgica M3 facilita la relajación rápida de los músculos de la faringe mediante hiperpolarización dependiente de cloruro. Dicha respuesta está mediada por GluCl α s expresados en células musculares de la faringe, conteniendo la subunidad AVR-15; GLC-2, como así también otras subunidades, podrían estar involucradas (Wolstenholme, 2012).

Estudios de expresión heteróloga han demostrado que las subunidades GluCl α 1 y GluCl β , clonadas de *C. elegans* y expresadas en ovocitos, pueden formar receptores homoméricos y heteroméricos funcionales. El receptor formado por subunidades GluCl α 1 responde a IVM y el que está compuesto por subunidades GluCl β responde a glutamato (Vassilatis et al., 1997; Li et al., 2002). Los heteropentámeros GluCl α 1/GluCl β responden a glutamato e IVM, y son modulados alostéricamente y positivamente por IVM (Dent et al., 1997; Holden-Dye y Walker, 2014; Degani-Katzav et al., 2016).

Las lactonas macrocíclicas son un grupo de antihelmínticos, insecticidas y acaricidas que actúan a través de GluCls (Brockie y Maricq 2006; Wolstenholme, 2012; Chen y Kubo, 2018). Pueden activar directamente los canales iónicos generando la apertura de los mismos o potenciar los efectos del agonista glutamato. La activación directa de los canales es mucho más lenta que la de los transmisores clásicos, pero una vez que el canal se abre permanece en ese estado por un largo periodo de tiempo. En los registros electrofisiológicos se determinó que la acción de IVM es irreversible (Wolstenholme, 2012).

Las avermectinas, aisladas del microorganismo del suelo *Streptomyces avermitilis*, conforman una familia de lactonas macrocíclicas naturales con potente actividad nematocida (Lynagh y Lynch, 2012; Holden-Dye y Walker, 2014). Tienen propiedades antibióticas y antihelmínticas de amplio espectro y son utilizadas para controlar nematodos parásitos tanto en el hombre como en animales.

La avermectina B1 fue refinada y de ella se obtuvo la IVM, un derivado más seguro y potente (80 % B1a y 20 % B1b) (Laing et al., 2017). En 1981 la IVM llegó al mercado comercial por sus múltiples usos para conservar la salud de los animales y seis años más tarde fue registrada para el uso en humanos, ya que, según la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA), es muy segura y no es tóxica. Esta droga presenta una estructura única, es efectiva contra helmintos, arácnidos e insectos, pero no actúa contra gusanos planos, protozoos, bacterias y fungi. Es efectiva a dosis bajas y fácil de administrar de manera oral, tópica o parenteral. Bloquea la neurotransmisión interfiriendo en la sinapsis neuromuscular (Ōmura, 2008; Lynagh y Lynch, 2012).

La IVM ha sido utilizada para combatir la ceguera del río (oncocercosis) causada por el nematodo parásito *Onchocerca volvulus*. Para ello se llevó a cabo un programa de control mediante el cual se arrojó un *spray* aéreo con IVM sobre ríos para matar las larvas del mosquito vector que transmite la enfermedad. Posteriormente su uso se extendió para tratar otras enfermedades que afectan al hombre como la filariasis linfática, estrongiloidiasis, sarna y piojos

(Ömura, 2008; Lynagh y Lynch, 2012; Wolstenholme, 2012). En veterinaria es utilizada para tratar nematodos gastrointestinales y pulmonares que afectan a diversos animales (Campbell, 2012).

La IVM interactúa con una gran variedad de canales iónicos activados por ligandos, tales como nAChR, $\alpha 7$, canales de cloruro activados por ACh, GABA, histamina, receptores de glicina y receptores P2X4 (Laing et al., 2017). Sin embargo, presenta una mayor afinidad por los GluCl_s de nematodos. Al actuar como agonista de GluCl_s, paraliza músculos de la faringe y somáticos, y esto se correlaciona con su potente actividad antihelmíntica (Holden-Dye y Walker, 2007; Ömura, 2008; Lynagh y Lynch, 2012; Holden-Dye y Walker, 2014; Meyers et al., 2015)

Recientemente se resolvió la estructura tridimensional del primer receptor *Cys-loop* aniónico activado por ligando de eucariota, el homopentámero GluCl α (GLC-1) de *C. elegans* junto con IVM unida a su sitio (Hibbs y Gouaux, 2011; Wolstenholme, 2012). La estructura reveló información sobre el sitio de unión del agonista alostérico IVM, el agonista ortostérico L-glutamato y del bloqueador de canal abierto picrotoxina (Hibbs y Gouaux, 2011). Glutamato se une al sitio ortostérico ubicado en el ECD entre los *loops* A, B y C de la cara principal de una subunidad, y los *loops* D, E, F y G de la cara complementaria de la subunidad adyacente. IVM actúa como un agonista alostérico dado que no se une al sitio de glutamato, sino que ocupa una cavidad entre subunidades adyacentes en el TMD. Esta cavidad, en LGICs de mamíferos contiene sitios de unión para varios moduladores de la activación inducida por agonistas (Lynagh y Lynch, 2012; Lynagh et al., 2014; Degani-Katzav et al., 2016).

La IVM activa GluCl_s en ausencia del agonista endógeno glutamato mediante la unión a un sitio transmembrana, es decir que estos receptores pueden ser activados por ligandos alostéricos que interactúan con sitios del receptor diferentes al ortostérico (Lansdell et al., 2015). La elevada potencia de la IVM radica en su capacidad de mantener GluCl_s aniónicos continuamente abiertos, lo cual genera una hiperpolarización en las membranas postsinápticas de nematodos parásitos. En consecuencia, se suprime la excitación en neuronas motoras y se inhibe la locomoción, se inhibe la actividad de los músculos de la faringe que interrumpe el comportamiento de alimentación y, se lleva a cabo la interrupción de los procesos de secreción que son cruciales para evadir la respuesta inmune del hospedador (Degani-Katzav et al., 2016).

Muchas drogas antihelmínticas están perdiendo su efectividad debido a la adquisición de resistencia, es decir se da una rápida selección de nematodos parásitos que son capaces de sobrevivir al tratamiento con la droga. La resistencia a IVM podría estar asociada por un lado a modificaciones en los patrones de expresión de la glicoproteína P (P-gp) (Lanusse et al., 2018).

La P-gp, que transporta avermectinas fuera del sistema nervioso, es esencial para la potencia de la IVM en mamíferos y nematodos ya que cuando dicha proteína presenta mutaciones se incrementa la toxicidad de la IVM (Lynagh y Lynch, 2012). Por otro lado, la resistencia a IVM podría ocurrir como consecuencia de mutaciones que afectan la sensibilidad a la droga en receptores *Cys-loop*, mutaciones en la secuencia codificante o cambios en los niveles de expresión de GluCl_s o GABA_AR_s y mutaciones que alostéricamente disrumpen la eficacia con la que IVM activa el receptor, sin necesidad de afectar la afinidad (Lynagh y Lynch, 2012). Un residuo clave que media el efecto de la IVM en los receptores GluCl_s se encuentra en la posición G36' del dominio transmembranal M3 que forma parte del bolsillo de unión de la IVM. Mutaciones a glutamato, aspartato o alanina producen marcadas reducciones en la sensibilidad a IVM. El residuo G36' facilita la activación y modulación positiva por IVM. Además, se ha reportado que residuos o segmentos del *loop* intracelular M3-M4 afectan la sensibilidad de la droga y las propiedades de activación de LGICs (Atif et al., 2020).

El mecanismo de resistencia a IVM ha sido estudiado en *C. elegans*. Altos niveles de resistencia a IVM requieren mutaciones en al menos tres genes: *glc-1*, *avr-14* y *avr-15*. Se sabe que otros genes encargados de regular la permeabilidad de la membrana (*osm-1*) y las uniones *gap* (*unc-7* y *unc-9*) también están involucrados (Holden-Dye y Walker, 2007). Por otro lado, se ha reportado que ciertos cambios en la actividad de la P-gp estarían asociados a la resistencia. Un aumento en la expresión de genes *pgp* incrementa la resistencia a IVM, mientras que la pérdida de función de P-gp individuales genera un aumento en la sensibilidad a IVM (Holden-Dye y Walker, 2014).

Debido a la emergencia de resistencia a IVM en nematodos parásitos, es esencial la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos con propiedades antihelmínticas. Con este fin, en un trabajo de colaboración del laboratorio se sintetizó una serie de compuestos tricíclicos oxigenados y se determinó su actividad antihelmíntica mediante medición de efectos rápidos en *C. elegans*. La exposición a dibenzo[*b,e*] oxepin-11(6H)-ona (doxepinona) produjo una disminución rápida en la velocidad de *thrashes* dependiente de la concentración (IC₅₀ ~300 μM), que es una medida de la motilidad y velocidad de nado de *C. elegans* (Buckingham y Sattelle, 2009; Scoccia et al., 2017). Doxepinona es considerada una estructura privilegiada compuesta por un sistema de anillos conectados de forma tal que no pueden rotar alrededor de las uniones carbono-carbono. Presenta residuos en orientaciones bien definidas requeridas para el reconocimiento de los blancos (Evans et al., 1988). Mediante modificaciones de sus grupos funcionales, estas estructuras pueden proveer de ligandos para receptores biológicos, y son, por lo tanto, de interés en el amplio espectro de las ciencias. Debido a que la doxepinona es una

estructura considerada privilegiada con potencial actividad antihelmíntica, se exploró en detalle sus efectos en los patrones de comportamiento y se descifró sus receptores blancos y mecanismos de acción en *C. elegans* como modelo de nematodo parásito. En este Capítulo de la Tesis se propone a la doxepinona como un atractivo compuesto líder con potencial actividad antiparasitaria mediada, al menos en gran parte, por los GluCl_s.

Objetivo general

El objetivo general de este Capítulo fue definir el blanco molecular del compuesto sintético doxepinona utilizando a *C. elegans* como modelo de nematodo parásito, comparar sus efectos con los del antiparasitario ivermectina y descifrar sus mecanismos de acción a nivel molecular.

Objetivos específicos

- Evaluar mediante ensayos de comportamiento el efecto de la doxepinona sobre nematodos salvajes en función del tiempo de exposición y de la concentración de droga utilizada.

- Definir el blanco molecular de la doxepinona mediante ensayos de comportamiento y utilizando cepas mutantes nulas en diversos receptores *Cys-loop*.

- Determinar el tipo de parálisis generado por la droga mediante ensayos de parálisis en placas de agar conteniendo doxepinona y midiendo la longitud relativa del cuerpo de los nematodos luego de la exposición a la droga.

- Corroborar los efectos de la droga antihelmíntica IVM en nematodos salvajes y mutantes que carecen de GluCl α 1 (cepa DA1316) a través de ensayos de comportamiento.

- Evaluar el efecto de la doxepinona sobre la velocidad del bombeo faríngeo, tanto en nematodos salvajes como en mutantes que carecen de GluCl α 1 (cepa DA1316), y comparar los efectos con los de la IVM.

- Caracterizar las corrientes macroscópicas evocadas por glutamato de GluCl α 1/GluCl β expresados en células BOSC 23.

- Determinar mediante corrientes macroscópicas si la doxepinona actúa como agonista y activa los GluCl α 1/GluCl β expresados en células BOSC 23.

- Evaluar a través de diferentes protocolos de aplicación de drogas la acción molecular de la doxepinona sobre las corrientes macroscópicas generadas por glutamato en GluCl α 1/GluCl β expresados en células BOSC 23.

Desarrollo y Resultados

Efectos de la doxepinona en *C. elegans*

Previamente se demostró a través de ensayos de movilidad en medio líquido que la dibenzo[*b,e*] oxepin-11(6H)-ona, denominada doxepinona, produce parálisis rápida en *C. elegans* salvajes (Scoccia et al., 2017). En los ensayos se vio que, luego de 10 minutos de exposición, el compuesto generaba una disminución en la velocidad de nado del nematodo dependiente de la concentración ($IC_{50} \sim 300 \mu M$) (Scoccia et al., 2017). Dado que la doxepinona es una molécula sintética interesante, con potencial actividad antihelmíntica, en este Capítulo de la Tesis se exploraron en detalle sus efectos antihelmínticos y se identificaron sus sitios de unión.

Primero, para comprender mejor el efecto de la doxepinona en nematodos salvajes se llevaron a cabo ensayos de parálisis en placa de agar utilizando un rango de concentraciones de la droga de 1 a 3 mM. Nematodos salvajes sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en placas de agar conteniendo diferentes concentraciones de la droga. Cada 30 minutos se contabilizó la fracción de nematodos que respondían al recibir un estímulo mecánico, considerados como individuos en movimiento. Con la concentración más elevada de doxepinona, 3 mM, aproximadamente el 85 % de los nematodos se paralizaron en el tiempo máximo de exposición (2 horas) (Figura 46, $n=30$). Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro ensayos independientes realizados para todas las condiciones descriptas en la Figura 46, y se utilizaron 30 nematodos para cada condición. Mediante estos resultados, se concluye que la parálisis de los nematodos salvajes generada por la doxepinona es dependiente tanto del tiempo de exposición como de la concentración utilizada (Figura 46).

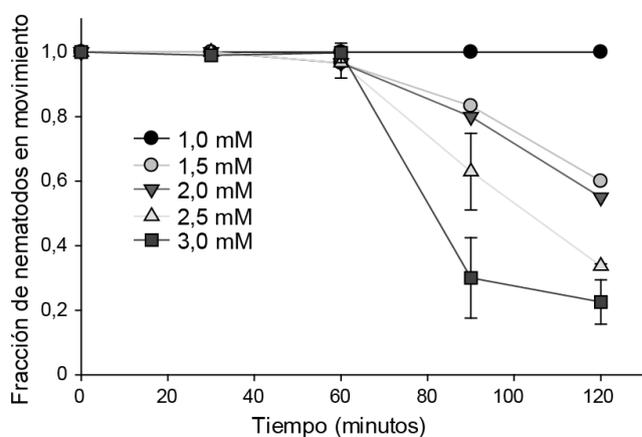


Figura 46: Fracción de nematodos en movimiento luego de la exposición a doxepinona en función del tiempo y la concentración. Nematodos salvajes expuestos a placas de agar conteniendo diversas concentraciones de doxepinona (rango 1-3 mM). La fracción de nematodos en movimiento fue determinada a intervalos de 30 minutos.

Luego se procedió a determinar el IC_{50} de la droga a diferentes tiempos de exposición. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de parálisis en placas de agar. Nematodos salvajes sincronizados en estadio adulto joven fueron expuestos a placas de agar conteniendo diferentes concentraciones de la droga y se registró la fracción de individuos en movimiento a los 90 y 120 minutos de exposición. Utilizando *SigmaPlot 12.0* se graficó la fracción de nematodos en movimiento en función de la concentración de la droga, se ajustaron los puntos obtenidos con la Ecuación de *Hill* y se obtuvieron los valores de IC_{50} . La concentración de droga que genera una inhibición del 50 % en el movimiento de los nematodos fue $2,58 \pm 0,01$ mM y $2,10 \pm 0,01$ mM para 90 y 120 minutos de exposición, respectivamente (Figura 47). Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro ensayos independientes para todas las condiciones descriptas en la Figura 47, y se utilizaron 30 nematodos por condición.

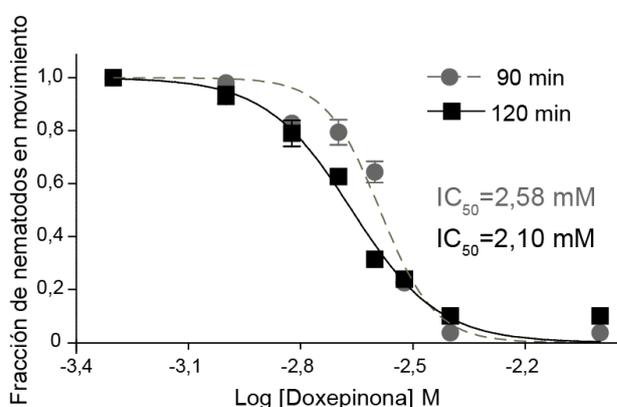


Figura 47: Curvas dosis-respuesta. Ensayos de parálisis en placas de agar utilizando nematodos salvajes expuestos durante 90 minutos (gris) y 120 minutos (negro) a diversas concentraciones de doxepinona.

Los GluCl_s están involucrados en los efectos rápidos de la doxepinona

Para determinar la contribución de receptores *Cys-loop* a los efectos de la doxepinona, se exploró el efecto de la droga en cepas mutantes que carecen de receptores *Cys-loop* involucrados en la locomoción del nematodo, y que son blancos de drogas antihelmínticas. El *screening* se basa en la hipótesis de que la ausencia del sitio de unión generará resistencia a la droga y, por lo tanto, el nematodo mutante no será paralizado en presencia de doxepinona. Diversos nematodos mutantes sincronizados en estadio adulto joven fueron expuestos a placas de agar conteniendo doxepinona 2,5 mM y se midió la fracción de nematodos en movimiento cada 30 minutos para cada uno de ellos. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro ensayos independientes para todas las condiciones y se utilizaron 30 nematodos por condición.

Se encontró que la reducción en la movilidad ocasionada por la droga en nematodos mutantes MT9668 (*mod-1(ok103) V*) que carecen del canal de cloruro activado por serotonina

MOD-1, CB904 (*unc-38(e264) I*) que carecen de la subunidad UNC-38 esencial para L-AChR y CB382 (*unc-49(e382) III*) que carecen de receptores UNC-49 (GABA), no difirió de la reducción generada en los nematodos salvajes. Como muestra la Figura 48, para estos mutantes la fracción de nematodos en movimiento se redujo un 60 % aproximadamente, luego de dos horas de exposición. Estos resultados indican, que los receptores MOD-1, L-AChR y UNC-49 no son los principales receptores involucrados en los efectos rápidos de la doxepinona.

Se observó una diferencia leve pero estadísticamente significativa entre el efecto de la droga en nematodos mutantes RB918 (*acr-16(ok789) V*), que carecen del nAChR sensible a nicotina (N-AChR), y nematodos salvajes luego de dos horas de exposición ($p < 0,01$ $n=30$) (Figura 48). Estos resultados indican algún tipo de contribución de los N-AChRs al efecto de la doxepinona.

En los nematodos mutantes DA1316 (*avr-14(ad1305) I; avr-15(vu227) glc-1(pk54) V*) que carecen de tres genes que codifican subunidades de GluCl1 se observó una pequeña reducción del 18 % en la fracción de individuos en movimiento, luego de dos horas de exposición a doxepinona. Dicha reducción fue marcadamente diferente a la generada en nematodos salvajes y otros mutantes (aproximadamente 60 %), lo cual indica que los GluCl1 están involucrados en la parálisis generada por la doxepinona (Figura 48).

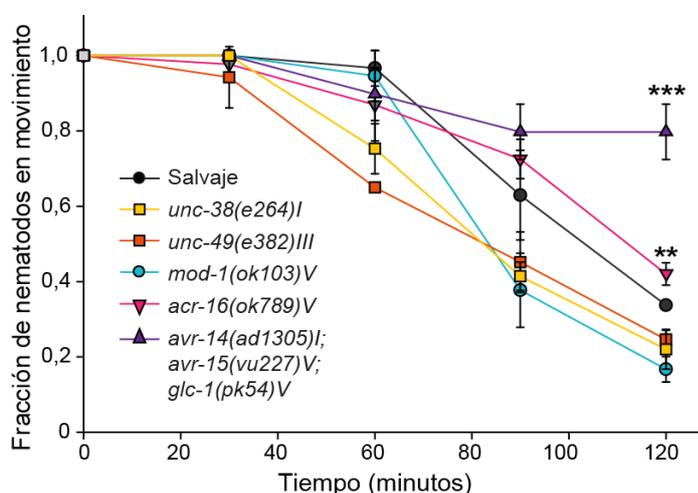


Figura 48: Fracción de nematodos en movimiento al ser expuestos a doxepinona 2,5 mM en función del tiempo. Las cepas utilizadas se indican con diversos colores. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en función de la cepa salvaje (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

Para confirmar los receptores blancos involucrados en los efectos rápidos de la doxepinona se llevó a cabo otro tipo de ensayo de comportamiento. Mediante ensayos de movilidad en medio líquido se exploró el efecto de la droga en las mismas cepas mutantes que

habían sido evaluadas en los ensayos de parálisis en placa de agar. El *screening* se basa en la hipótesis de que la ausencia del sitio de unión generará resistencia a la droga y, por lo tanto, la velocidad de nado en presencia de doxepinona no será afectada en el nematodo mutante.

Para llevar a cabo los ensayos, nematodos sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en cada pocillo de placas *multiwells* conteniendo *buffer* M9 junto con DMSO 1 % en la condición control o junto con doxepinona 0,1 mM en la condición tratada. Se esperó 30 minutos para que los nematodos se estabilicen en el medio líquido, y se contaron los *thrashes*/min de cada individuo bajo microscopio estereoscópico con zoom. Un *thrash* es definido como un cambio en la dirección de curvatura del cuerpo del nematodo.

Dado que algunas cepas mutantes presentan fenotipos descoordinados, se determinó el número de *thrashes*/min en medio líquido en nematodos salvajes y en cada cepa mutante tanto en ausencia como en presencia de doxepinona (Figura 49). Se utilizaron 20 nematodos de cada cepa para cada condición. Los experimentos fueron repetidos con diferentes *batches* de nematodos y en diferentes días, realizando en total, cuatro ensayos independientes. Los ensayos con mutantes se llevaron a cabo siempre en paralelo con la condición salvaje control.

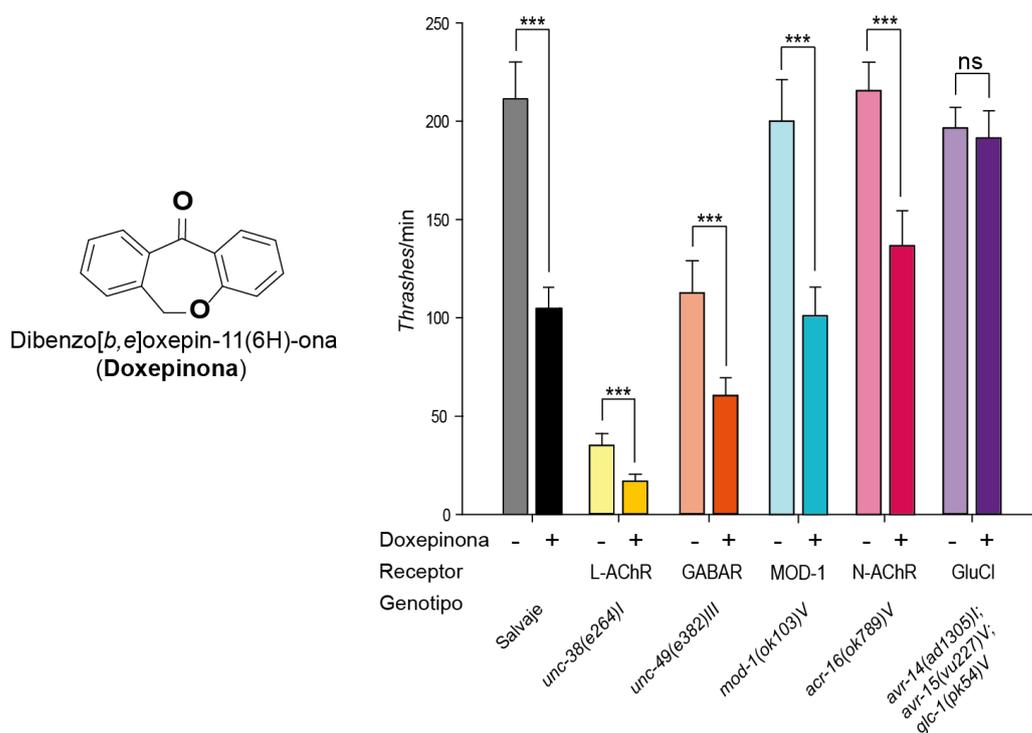


Figura 49: Screening de mutantes para resistencia a doxepinona. Izquierda: estructura química de la doxepinona. Derecha: el gráfico de barras muestra la velocidad de nado (*thrashes*/min) para cada cepa en ausencia y presencia de doxepinona. Los receptores no funcionales en cada cepa están indicados. Las barras representan el promedio \pm desvío estándar de cuatro ensayos por condición. La comparación

estadística fue realizada para cada cepa en ausencia y presencia de doxepinona. Ns: diferencia no significativa, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

La velocidad de nado de nematodos salvajes en *buffer* M9 junto con DMSO 1 % fue $204 \pm 9,3/\text{min}$ (Figura 49). Luego de una exposición durante 30 min a doxepinona 0,1 mM, la velocidad de nado se redujo aproximadamente el 50 % ($103 \text{ thrashes}/\text{min}$, $p < 0,001$, *Test t-Student*) (Figura 49).

En ausencia de la droga, los nematodos mutantes que carecen de la subunidad UNC-38, esencial para el L-AChR (cepa CB904, *unc-38(e264) I*), y aquellos que carecen de receptores UNC-49 (GABA) (cepa CB382, *unc-49(e382) III*) presentaban velocidades de nado más lentas en comparación con nematodos salvajes, además de fenotipos descoordinados (Brenner, 1974) (Figura 49). En presencia de doxepinona la velocidad de nado se redujo en ambos mutantes (Figura 49, $p < 0,001$), y dicha reducción fue similar a la observada en nematodos salvajes (Figura 50).

La cepa MT9668 (*mod-1(ok103) V*) carece del canal de cloruro activado por serotonina denominado MOD-1, involucrado en la locomoción y en el comportamiento del nematodo (Ranganathan et al., 2000; Komuniecki et al., 2012). Esta cepa mutante fue sensible a la droga (Figura 49, $p < 0,001$). La doxepinona generó una reducción en la velocidad de nado similar a la observada en nematodos salvajes (Figura 50). Por lo tanto, se puede concluir nuevamente en que los receptores L-AChR, UNC-49 (GABA) y MOD-1 no son los principales receptores involucrados en los efectos rápidos de la doxepinona.

La cepa RB918 (*acr-16(ok789) V*) que carece del receptor de nAChR sensible a nicotina (N-AChR) presente en músculo (Touroutine et al., 2005) también fue sensible a doxepinona (Figura 49). Si bien la reducción en la velocidad de nado en presencia de la droga fue leve, la diferencia al compararlo con la reducción en la velocidad de nado en la cepa salvaje fue estadísticamente significativa. Esto indicaría algún tipo de contribución del receptor N-AChR en la acción de la doxepinona (Figura 50, $p < 0,01$).

La velocidad de nado de los nematodos triple mutantes, que carecen de tres genes que codifican subunidades GluCl (cepa DA1316, *avr-14(ad1305) I; avr-15(vu227) glc-1(pk54) V*), fue similar a la de nematodos salvajes en ausencia de la droga (Figura 49). Llamativamente, la exposición a doxepinona 0,1 mM no afectó la velocidad de nado en la cepa mutante, en contraste con los efectos observados en la velocidad de nado de los nematodos salvajes (Figura 49, $n=20$, $p < 0,05$). La diferencia entre la reducción de la velocidad de nado en nematodos salvajes y mutantes DA1316, en presencia de doxepinona, fue estadísticamente significativa

(Figura 50, $p < 0,001$). En conjunto, estos resultados indican, al igual que los ensayos de parálisis en placa de agar, que los GluCl están involucrados en los efectos rápidos de la doxepinona.

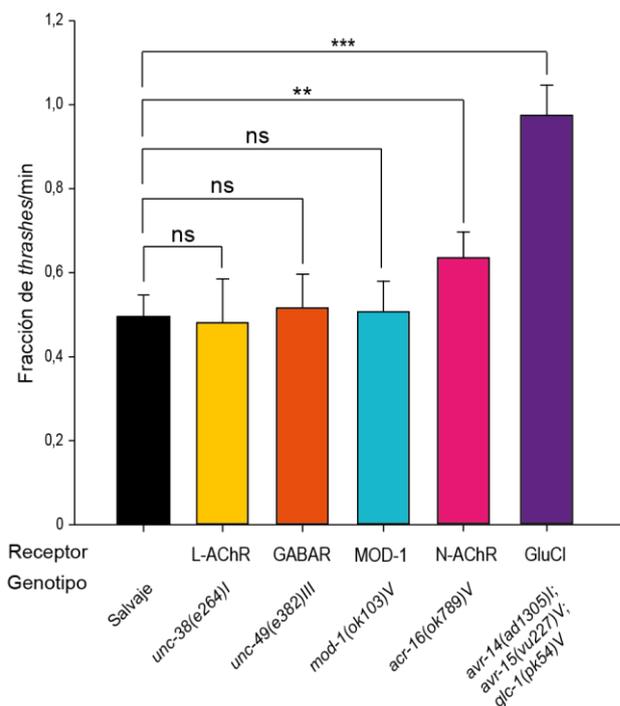


Figura 50: El gráfico de barras muestra la reducción en los *thrashes*/min en cada cepa debido a la presencia de doxepinona. Los receptores no funcionales en cada cepa están indicados. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas entre los cambios en cada cepa mutante y los cambios en la cepa salvaje. Ns: diferencia no significativa, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Caracterización de la parálisis generada por doxepinona

Para determinar el tipo de parálisis generada por la doxepinona se llevaron a cabo ensayos de parálisis en placas de agar conteniendo la droga en estudio.

Dado que las drogas antihelmínticas pueden generar diversos tipos de parálisis en los nematodos: flácida, espástica o estacionaria, se procedió a caracterizar el tipo de parálisis inducido por la doxepinona. Para ello, nematodos salvajes sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en placas de agar conteniendo doxepinona 2,5 mM. Luego de 60 minutos de exposición a la droga, los nematodos se encontraban inmóviles, pero al tocarlos aún respondían contrayendo la musculatura del cuerpo. Luego de 2 horas de exposición, los nematodos no presentaban ningún tipo de respuesta y estaban completamente paralizados.

Para caracterizar en mayor detalle el tipo de parálisis, se procedió a medir la RBL de cada nematodo luego de una hora de exposición a la droga. Para ello, mediante el uso de un microscopio estereoscópico con zoom y una cámara digital se tomaron fotografías y se midió la RBL con el *software FIJI-ImageJ*. La RBL de los nematodos en ausencia de la droga fue de $1,16 \pm 0,01$ mm y luego de una hora de exposición a la droga fue de $1,10 \pm 0,04$ mm ($n=10$, $p > 0,05$). Estos resultados indican que la doxepinona no genera parálisis tipo flácida ni espástica, ya que los nematodos no estaban distendidos ni contraídos, respectivamente. El tipo de parálisis

generado por la droga es estacionaria, los nematodos se encontraban paralizados, pero al tocarlos con la pestaña respondían contrayendo la musculatura del cuerpo.

Los mutantes que carecen de GluCl_s son resistentes a ivermectina

Dado que los GluCl_s son los blancos moleculares de la IVM, se procedió a comparar los efectos de dicha droga antihelmíntica en nematodos salvajes y mutantes DA1316 (*avr-14(ad1305) I; avr-15(vu227) glc-1(pk54) V*) que carecen de genes que codifican subunidades de GluCl_s.

Por un lado, se realizaron ensayos de movilidad en medio líquido. Nematodos salvajes y mutantes DA1316 sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en pocillos conteniendo *buffer* M9 con DMSO en la condición control o con IVM 10 μ M en la condición tratada. Luego de 30 minutos de exposición en medio líquido a IVM, los nematodos salvajes estaban completamente paralizados mientras que los mutantes DA1316 presentaban una reducción del 50 % de su velocidad de nado en comparación con la condición control sin droga (Figura 51). Los resultados indican que la cepa DA1316 es resistente a los efectos de la IVM.

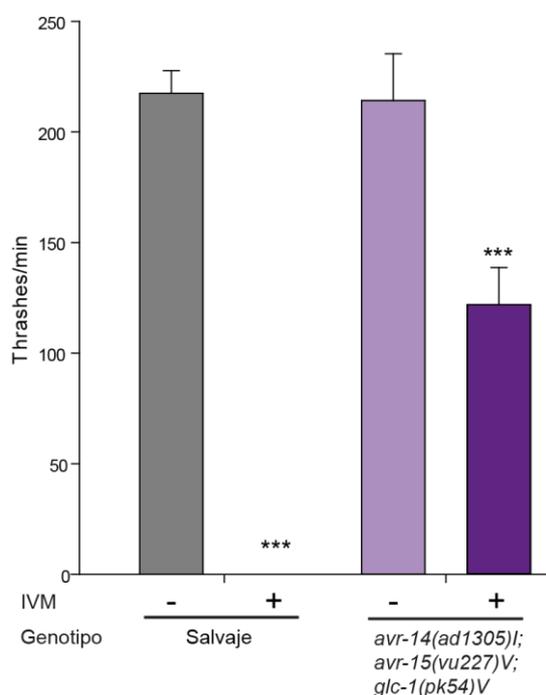


Figura 51: Efectos de la ivermectina en nematodos salvajes y mutantes que carecen de genes que codifican subunidades de GluCl_s. Nematodos salvajes y mutantes DA1316 sincronizados en estadio adulto joven fueron incubados durante 30 minutos en *buffer* M9 junto con DMSO 1 % en ausencia o presencia de IVM 10 μ M. Se utilizaron 20 nematodos por condición y se midieron los *thrashes*/min. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro ensayos independientes. Las comparaciones estadísticas se realizaron, entre presencia y ausencia de IVM para cada cepa

Por otro lado, se realizaron ensayos de parálisis en placas de agar conteniendo IVM 300 μ M. Los nematodos salvajes mostraron una parálisis dependiente del tiempo, el 80 % de los nematodos estaban paralizados luego de dos horas de exposición. En cambio, como muestra la Figura 52, el porcentaje de nematodos mutantes DA1316 paralizados luego de las dos horas de

exposición fue menor al 10 %. Luego de dos horas de exposición, la diferencia entre el porcentaje de nematodos salvajes y mutantes en movimiento fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$, $n=30$). Estos resultados confirman que la IVM actúa sobre los GluCl_s presentes en el nematodo.

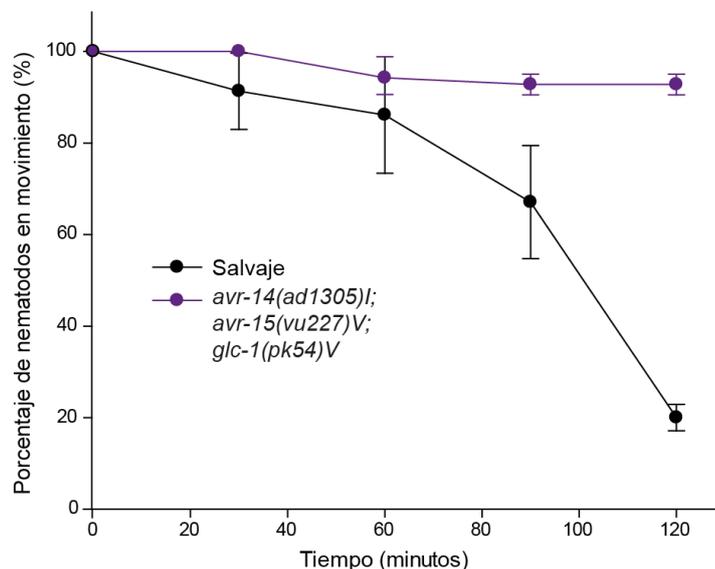


Figura 52: Nematodos salvajes y mutantes DA1316 sincronizados en estadio adulto joven fueron colocados en placas de agar conteniendo IVM 300 μ M. El gráfico muestra el porcentaje de nematodos en movimiento en función del tiempo de exposición para cada cepa. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro ensayos independientes y se utilizaron 30 nematodos por condición.

Mediante ensayos de parálisis en placa de agar también se determinó que, luego de 60 minutos de exposición a IVM 300 μ M, el tipo de parálisis generado en nematodos salvajes era similar al observado en nematodos salvajes expuestos a doxepinona: los individuos se encontraban inmóviles, pero respondían a un estímulo mecánico contrayendo la musculatura corporal (Hernando y Bouzat, 2014). Se puede concluir en que tanto la IVM como la doxepinona generan el mismo tipo de parálisis en nematodos salvajes.

Doxepinona reduce la velocidad del bombeo faríngeo

Uno de los efectos distintivos de la IVM, que involucra a los GluCl_s, es la inhibición del bombeo faríngeo (Dent et al., 1997; Dent et al., 2000). Por este motivo, se evaluó el efecto de la doxepinona sobre la velocidad del bombeo faríngeo, tanto en nematodos salvajes como en mutantes que carecen de genes que codifican subunidades de GluCl_s (cepa DA1316).

Para llevar a cabo dichos experimentos, nematodos de ambas cepas sincronizados en estadio adulto joven fueron transferidos a placas NGM con bacteria OP50 y diferentes concentraciones de IVM y doxepinona (IVM = 1 μ M, doxepinona = 50 y 100 μ M). Para la

condición control, nematodos fueron colocados en placas NGM con bacteria OP50 en ausencia de drogas. Luego de 30 minutos de exposición a las drogas, se registró el número de contracciones del bulbo terminal de la faringe por minuto mediante microscopio estereoscópico con zoom.

En ausencia de drogas, tanto nematodos salvajes como mutantes DA1316 presentaban velocidades similares de bombeo faríngeo de aproximadamente 180-200/min (Figura 53). A pesar de la ausencia de GluCl_s, los nematodos mutantes presentan bombeo faríngeo normal debido, por un lado, a efectos compensatorios y por otro a que la IVM afecta otros receptores *Cys-loop* (Pemberton et al., 2001; Lynagh y Lynch, 2012; Trojanowski et al., 2016).

En primer lugar, se evaluó el efecto de la IVM. La exposición de nematodos salvajes y mutantes DA1316 a IVM 1 μ M disminuyó la velocidad del bombeo faríngeo 4 y 1,7 veces, respectivamente ($p < 0,001$, $n=14$) (Figura 53). Estos resultados confirman que los nematodos mutantes que carecen de las subunidades de GluCl_s son más resistentes a la inhibición del bombeo faríngeo generada por IVM (Figura 53).

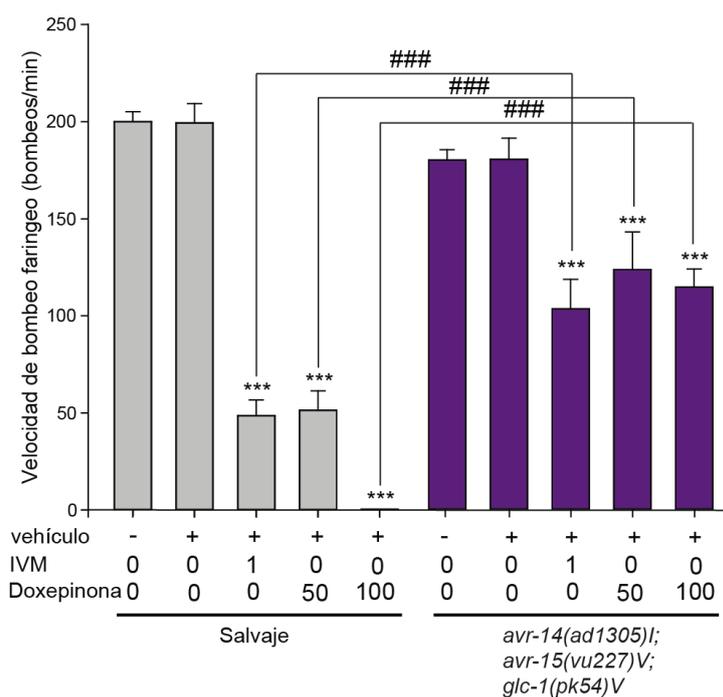


Figura 53. Efectos de la IVM y doxepinona sobre el bombeo faríngeo. Nematodos salvajes y mutantes DA1316 sincronizados en estadio adulto jóvenes fueron transferidos a placas NGM con bacteria y diferentes concentraciones de IVM y doxepinona (IVM = 1 μ M, doxepinona = 50 y 100 μ M). Se utilizaron 14 nematodos por condición. Luego de 30 minutos de exposición a las drogas, se registró el número de contracciones del bulbo terminal de la faringe por minuto mediante microscopio estereoscópico con zoom. Las barras representan el promedio de contracciones \pm desvío estándar para cada condición. Las

comparaciones estadísticas fueron realizadas con la condición no tratada dentro de la misma cepa (***) $p < 0,001$) y entre cepas (###) $p < 0,001$).

Luego se procedió a evaluar el efecto de la doxepinona. En nematodos salvajes, concentraciones elevadas de doxepinona generaron una disminución monotónica de la velocidad de bombeo faríngeo. En presencia de doxepinona 50 μM , la velocidad de bombeo se redujo 4 veces, y con 100 μM se redujo un 100 % (Figura 53). Cuando nematodos mutantes DA1316 fueron expuestos a doxepinona 100 μM , el bombeo faríngeo se redujo solo 1,5 veces aproximadamente. Estos resultados indican que los nematodos mutantes son resistentes a los efectos de la doxepinona sobre el bombeo faríngeo (Figura 53). De esta forma, la acción de la doxepinona se correlaciona con la de IVM, apoyando una vez más que depende de GluCl β .

Los ensayos de comportamiento de este Capítulo fueron realizados en conjunto con la Dra. María Julia Castro.

Caracterización molecular de GluCl β heteroméricos GluCl α 1/GluCl β

Para concluir de manera inequívoca en que doxepinona actúa sobre GluCl β , se evaluaron sus efectos moleculares sobre este receptor. En primer lugar, se procedió a caracterizar las corrientes de GluCl β heteroméricos GluCl α 1/GluCl β evocadas por glutamato. Para ello se puso a punto la expresión de las subunidades GluCl α 1 y GluCl β en células BOSC 23 mediante el uso de un sistema de expresión heteróloga, ya que estos sistemas presentan numerosas ventajas para caracterizar la acción de fármacos sobre un receptor particular. Dado que GluCl α 1 contiene *gfp*, fue posible reconocer, mediante óptica de fluorescencia, células que expresan al receptor. Utilizando un microscopio de fluorescencia se seleccionó una célula verde y se realizó un sello de alta resistencia utilizando una pipeta cargada con ICS. Luego se aplicó presión negativa para perforar la célula y tener acceso al interior celular. Finalmente se perfundió ECS conteniendo glutamato 3 mM y se registraron las corrientes macroscópicas en configuración *whole-cell* generadas por la activación de todos los receptores expresados en la célula a un potencial de pipeta de -60 mV.

Las corrientes fueron generadas por aplicación rápida de glutamato 3 mM, una concentración mayor a la EC_{50} para estos receptores (1,5 mM) pero menor a la requerida para la saturación (Cully et al., 1994; Degani-Katzav et al., 2016). Pulsos de glutamato 3 mM en ECS perfundidos durante 6 segundos generaban corrientes macroscópicas que alcanzaban el pico máximo de la corriente con un $tr_{20-80\%}$ de $49,30 \pm 16,20$ ms ($n=9$) y decaían en presencia del agonista debido a la desensibilización de los receptores. En general los picos de las corrientes variaron entre 2000 y 7000 pA. La caída de la corriente fue ajustada con un solo componente, y

la constante de tiempo de decaimiento (τ_d) fue de 2100 ± 1040 ms ($n=9$). La aplicación de otro pulso de glutamato, luego de 20 segundos de lavado con ECS, permitió la recuperación total del pico de corriente. Esto indica que, luego de dicho periodo de tiempo en ausencia del agonista, la mayoría de los receptores se recuperaron de la desensibilización (Figura 54).

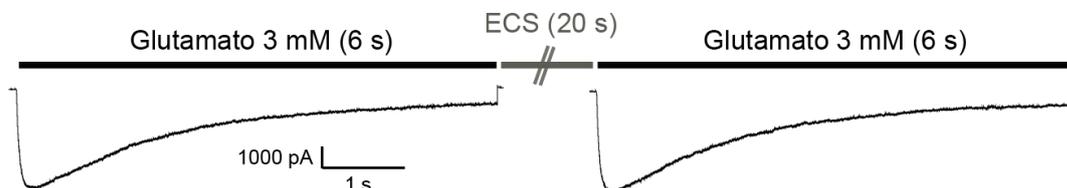


Figura 54: Respuesta macroscópica de receptores GluCl α 1/ β expresados heterológicamente en células de mamíferos. Corrientes macroscópicas generadas por glutamato 3 mM en configuración *whole-cell*. Respuestas representativas a glutamato en una sola célula. La célula fue expuesta durante 6 segundos a ECS conteniendo glutamato 3 mM, luego a ECS solo durante 20 segundos y finalmente a ECS conteniendo glutamato 3 mM durante 6 segundos. Potencial de pipeta: -60 mV.

Para caracterizar en mayor detalle las corrientes mediadas por GluCl α , se construyeron relaciones corriente-voltaje. Se registraron las corrientes macroscópicas generadas por ECS conteniendo glutamato 3 mM en función del potencial de pipeta aplicado (-100 a 100 mV) (Figura 55). Los picos de las corrientes obtenidas se normalizaron en función del pico de corriente máximo. Los resultados de varias células fueron promediados y graficados. Los puntos obtenidos fueron ajustados mediante regresión lineal utilizando *SigmaPlot 12.0*. Como muestra la Figura 55, la magnitud de las corrientes generadas por GluCl α aumenta linealmente con el voltaje, indicando un comportamiento óhmico. Además, las corrientes no muestran una rectificación significativa ($n=4$).

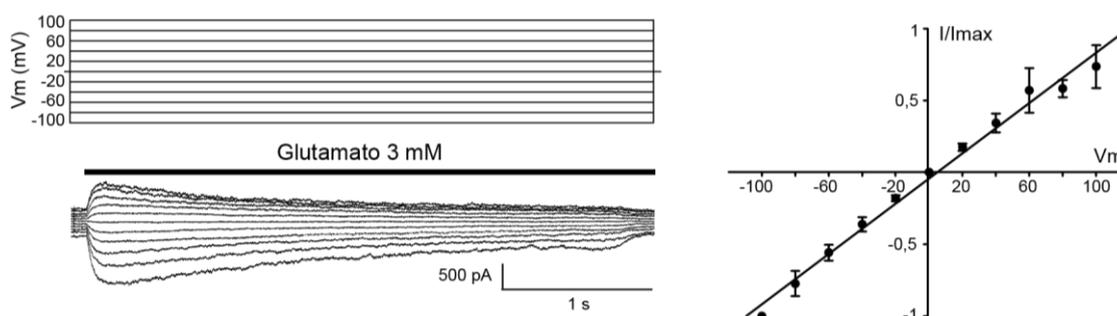


Figura 55: Izquierda: Corrientes macroscópicas generadas por pulsos de glutamato 3 mM durante 6 segundos a diferentes potenciales de pipeta (desde 100 a -100 mV). **Derecha:** Relación corriente-voltaje

para canales GluCl_s bajo soluciones de cloruro simétricas. Cada punto representa el promedio de cuatro células \pm desvío estándar.

Doxepinona no actúa como agonista de GluCl_s

Para descifrar las acciones moleculares de la doxepinona sobre GluCl_s heteroméricos GluCl α 1/GluCl β , en primer lugar, se determinó si la droga era capaz de activar dichos receptores. Para ello, se expresaron las subunidades GluCl α 1 y GluCl β en células BOSC 23 mediante sistema de expresión heterólogo. Se seleccionaron células verdes bajo microscopio de fluorescencia, se realizaron sellos con las pipetas cargadas con ICS y se aplicaron pulsos de 6 segundos perfundiendo ECS con doxepinona 0,5 mM (n=7) o 1 mM (n=3) en configuración *whole-cell* a un potencial de pipeta de -60 mV. No se obtuvieron corrientes evocadas por doxepinona en las concentraciones testeadas, sin embargo, al perfundir secuencialmente en las mismas células glutamato 3 mM se obtuvieron corrientes macroscópicas, indicando la presencia de GluCl_s funcionales (Figura 56). Con estos resultados, se puede concluir que la doxepinona no actúa como agonista de GluCl_s.

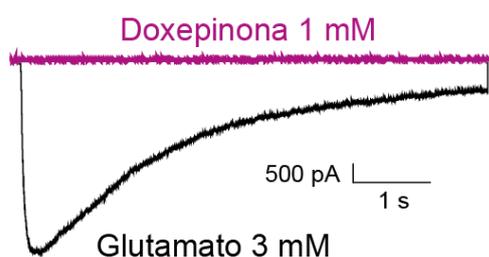


Figura 56: Células expresando GluCl_s heteroméricos GluCl α 1/GluCl β , fueron expuestas a ECS conteniendo glutamato 3 mM durante 6 segundos (corriente línea negra), luego a ECS conteniendo doxepinona 1 mM durante 6 segundos (corriente línea violeta) y finalmente a ECS conteniendo glutamato 3 mM para verificar la recuperación de la corriente. Potencial de pipeta: -60 mV.

Doxepinona inhibe los GluCl_s de *C. elegans*

Luego se evaluó la acción de la doxepinona como modulador de las corrientes de GluCl_s activadas por glutamato. Para ello se utilizaron dos protocolos diferentes de aplicación, uno incluía la preincubación con la droga luego de la aplicación de glutamato (Protocolo de preincubación +/-), y el otro, la aplicación de doxepinona junto con glutamato (Protocolo de co-aplicación -/+).

Para el protocolo de preincubación, se seleccionó una célula expresando GluCl_s heteroméricos GluCl α 1/GluCl β , se realizó un sello de alta resistencia y se rompió la membrana para acceder al interior celular. Luego se aplicó un pulso de ECS conteniendo glutamato 3 mM durante 6 segundos a un potencial de pipeta de -60 mV para obtener la corriente control.

Posteriormente la célula fue incubada durante 1 minuto con ECS conteniendo doxepinona 1 mM. Se aplicó un segundo pulso de ECS conteniendo glutamato 3 mM durante 6 segundos a un potencial de pipeta de -60 mV para obtener la corriente tratada (Figura 57). El mismo protocolo fue repetido 3 veces en la misma célula, cada vez separada por un período de 60 segundos de lavado con ECS.

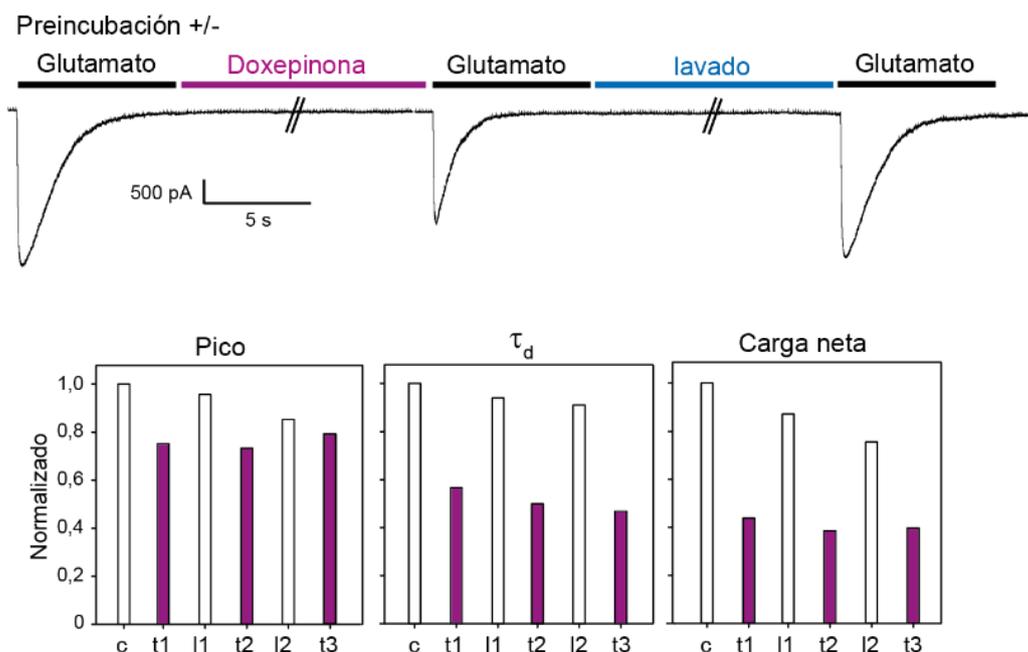


Figura 57: Protocolo de preincubación. Figura superior: Pulso de glutamato 3 mM durante 6 segundos aplicado antes (corriente control, c) y después (corriente tratada, t) de la incubación durante 1 minuto con doxepinona 1 mM. Las corrientes fueron registradas luego de 1 minuto de lavado con ECS para confirmar la recuperación (recuperada, l). Este protocolo se repitió 3 veces en cada célula. Potencial de pipeta: -60 mV. Figura inferior: Ejemplo ilustrativo de los cambios en los parámetros de las corrientes macroscópicas obtenidos luego de cada aplicación de glutamato 3 mM en una célula individual con el protocolo mostrado en la imagen superior. c=corriente control, t y l corresponden a la corriente activada por glutamato obtenida luego de 1 minuto de incubación con doxepinona 1 mM (tratada, t) o con *buffer* solo (lavado, l). El subíndice corresponde al orden de aplicación de agonista en las series.

Un ejemplo ilustrativo del procedimiento experimental llevado a cabo en una célula se muestra en la Figura 57. En esta se esquematiza mediante gráficos de barras los efectos generados por la doxepinona en el pico, en τ_d y en la carga neta de la corriente. Se indica la condición control (c) correspondiente a la corriente generada por glutamato, las corrientes tratadas (t) generadas por glutamato luego de la preincubación con la droga y las corrientes generadas por glutamato luego de los lavados con ECS (l). Los subíndices corresponden al orden de aplicación del agonista en la serie.

La preincubación de las células con doxepinona 1 mM produjo una leve reducción en el pico de corriente y una marcada disminución en τ_d y en la carga neta de la corriente. Los resultados obtenidos de las diferentes células fueron promediados y esquematizados en un gráfico de barras como muestra la Figura 58. Comparado con la corriente control correspondiente en cada célula, el pico de corriente se redujo a $0,81 \pm 0,08$ ($p=0,001$), τ_d a $0,57 \pm 0,13$ ($p=0,001$) y la carga neta a $0,49 \pm 0,11$ ($p=0,002$, $n=6$). El porcentaje de cambio, luego de la aplicación de la droga, era similar a lo largo de las tres aplicaciones en la misma célula.

Por lo tanto, el principal efecto de la droga sobre las corrientes generadas por glutamato fue el aumento en la velocidad de decaimiento (o disminución de τ_d) de la corriente, que ocasionó una disminución concomitante en la carga neta.

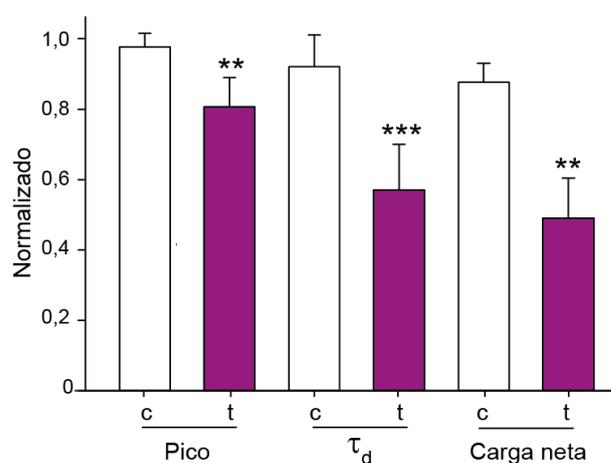
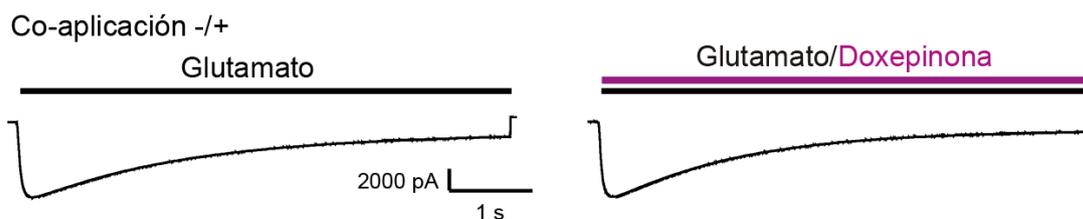


Figura 58: El gráfico de barras muestra el cambio promedio en el pico, en τ_d y la carga neta de la corriente como consecuencia de la preincubación con doxepinona 1 mM (t). Para cada experimento, los tres parámetros se relacionan con su corriente control en cada célula (c). Los valores corresponden al promedio \pm desvío estándar de 6 células diferentes y 4 días de transfección distintos. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en cada parámetro entre control y tratado (*** $p<0,001$, ** $p<0,01$ y * $p<0,05$).

Como control del vehículo utilizado para disolver la droga, se realizaron preincubaciones con DMSO 0,2 % en ECS en ausencia de doxepinona. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el pico de corriente ($1,01 \pm 0,10$), en τ_d ($0,95 \pm 0,06$) ni en la carga neta ($0,99 \pm 0,17$) de las corrientes tratadas con respecto a las corrientes control en cada célula ($n=4$).

También se exploró si la doxepinona aplicada junto con glutamato, a través de un protocolo de co-aplicación, afectaba las corrientes de GluCl_s. Se seleccionó una célula transfectada con GluCl_s heteroméricos GluCl α 1/GluCl β , se realizó un sello de alta resistencia y

se rompió la membrana para acceder al interior celular. Se aplicaron 3 pulsos de ECS conteniendo glutamato 3 mM. Cada pulso fue aplicado durante 6 segundos a -60 mV potencial de membrana y separado del pulso siguiente por 20 segundos de *buffer* ECS. Se registraron las corrientes generadas por todos los canales presentes en la célula. Luego, en la misma célula, se aplicaron 3 pulsos de ECS conteniendo glutamato 3 mM junto con doxepinona 1 mM. Cada pulso fue aplicado durante 6 segundos a -60 mV potencial de membrana y separado del pulso siguiente por 20 segundos de *buffer* ECS. Finalmente se registraron las corrientes macroscópicas



generadas por glutamato junto con doxepinona (Figura 59).

Figura 59: Protocolo de co-aplicación Pulsos de glutamato 3 mM durante 6 segundos aplicados solos (corriente control, línea negra) y luego junto con doxepinona 1 mM (corriente tratada, línea violeta). Potencial de pipeta: - 60 mV.

Al analizar las corrientes obtenidas se encontró que la doxepinona, al ser aplicada junto con glutamato, no produce cambios estadísticamente significativos en el pico de la corriente ($0,99 \pm 0,02$, $p=0,319$) generada por glutamato. Sin embargo, produce una disminución leve pero estadísticamente significativa en τ_d ($0,76 \pm 0,10$, $p=0,008$) y en la carga neta de la corriente ($0,83 \pm 0,06$, $p=0,001$) ($n=5$ células) (Figura 60). El gráfico de barras de la Figura 60 muestra el efecto en el pico, en τ_d y en la carga neta de la corriente al aplicar glutamato junto con doxepinona (t) en comparación a la condición control (c) en la cual se aplica solo glutamato.

Se puede concluir que la co-aplicación de glutamato con doxepinona inhibe las corrientes activadas por glutamato, aunque los cambios son menores a los observados en el protocolo de preincubación.

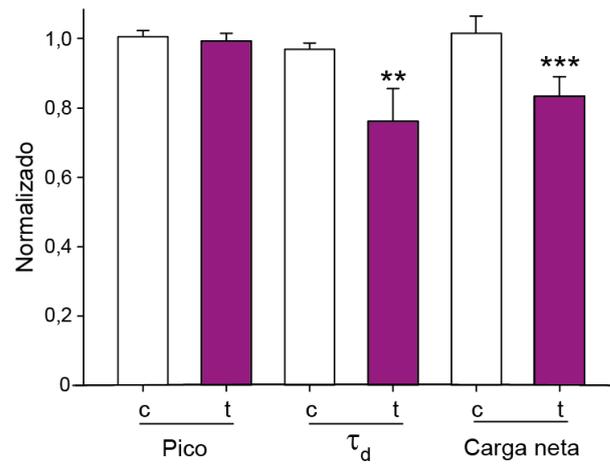


Figura 60: El gráfico de barras muestra el efecto de la co-aplicación de glutamato 3 mM/ doxepinona 1 mM en el pico, en τ_d y en la carga neta de la corriente. Los valores corresponden al promedio \pm desvío estándar de 5 células diferentes. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas en cada parámetro entre control y tratado (** $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ y * $p < 0,05$).

Discusión

En este Capítulo de la Tesis se definió a la dibenzo[*b,e*]oxepin-11(6H)-ona (doxepinona) como un nuevo compuesto antihelmíntico que actúa sobre GluCl_s a través de un mecanismo diferente al de la IVM, una droga antihelmíntica ampliamente utilizada a nivel mundial. Asimismo, se propuso la inhibición de GluCl_s como un mecanismo de acción de las drogas antihelmínticas.

La acción antihelmíntica de la doxepinona en nematodos salvajes fue revelada por la inducción de parálisis medida en placas de agar, la inhibición de la movilidad en medio líquido y una importante reducción en la velocidad del bombeo faríngeo. Debido a que los efectos rápidos, como los generados por la droga, podrían estar mediados por canales iónicos, se llevó a cabo un *screening* para resistencia a doxepinona utilizando cepas mutantes nulas que carecen de diferentes receptores *Cys-loop* involucrados en la locomoción del nematodo. A través del *screening* se identificaron los GluCl_s, principales receptores blanco de la IVM, como blancos moleculares de la doxepinona. Se demostró que los efectos de la doxepinona, inhibición del bombeo faríngeo y parálisis estacionaria, imitan los efectos de la IVM.

El *screening* realizado con cepas mutantes demostró que los N-AChRs tienen cierto rol en la parálisis inducida por doxepinona. En los ensayos se vio que los nematodos mutantes que carecen de la subunidad ACR-16 eran menos sensibles a la droga en comparación a los nematodos salvajes. Sin embargo, dicho efecto no fue tan relevante como el mediado por los GluCl_s. Si bien se plantea que tanto los N-AChRs como los GluCl_s son blancos moleculares de la doxepinona, no puede descartarse la opción de que otros receptores, no explorados en este Capítulo, puedan estar involucrados en los efectos de la droga en *C. elegans*. Además, para continuar con este nuevo hallazgo, sería muy interesante realizar estudios en nematodos parásitos con el objeto de confirmar que estos organismos responden a la doxepinona de manera similar a los nematodos de vida libre.

La cepa mutante DA1316 fue utilizada para realizar todos los ensayos de comportamiento. Esta carece de tres genes, *avr-14*, *avr-15* y *glc-1*, que codifican subunidades de GluCl_s y presenta elevada resistencia a IVM (Dent et al., 2000). El gran número de subunidades de receptores identificadas en *C. elegans* sugiere que el nematodo tiene la capacidad de expresar una gran diversidad de GluCl_s funcionales. Por lo tanto, sería interesante explorar en futuros trabajos los efectos moleculares de doxepinona sobre otros subtipos de GluCl_s (Brockie y Maricq, 2006).

Los GluCl_s inhibitorios expresan en neuronas y músculos a lo largo del Phyla Protostomados, incluyendo moluscos, gusanos planos, nematodos y ácaros, como así también insectos y crustáceos (Wolstenholme, 2012). Estos receptores son de gran importancia ya que constituyen uno de los principales blancos moleculares para el control de parásitos. Las lactonas macrocíclicas son un grupo de antihelmínticos, insecticidas y acaricidas que actúan a través de GluCl_s activando directamente los canales o potenciando la respuesta generada por el agonista glutamato (Wolstenholme, 2012). Una lactona macrocíclica muy conocida, y que se transformó en el agente antiparasitario de amplio espectro más exitoso, es la IVM. Esta droga es utilizada para eliminar infecciones de nematodos que causan enfermedades como ceguera del río y filariasis linfática, afectando a millones de personas. También es utilizada para tratar nematodos parásitos y ectoparásitos que afectan tanto a animales domésticos como al ganado (Ōmura, 2008). Los GluCl_s también han sido propuestos como blancos moleculares de la IVM en *Anopheles gambiae sensu stricto*. Esta droga mata al mosquito y disrumpe la transmisión de *Plasmodium falciparum*, permitiendo controlar la malaria (Meyers et al., 2015; Atif et al., 2020).

En *C. elegans* el patrón de expresión de los diferentes genes que codifican subunidades de GluCl_s ha sido explorado, tal como se muestra en la Tabla 6 de la introducción del Capítulo. La farmacología de los canales formados por las distintas subunidades de GluCl_s ha sido definida mediante sistemas de expresión heteróloga (Holden-Dye y Walker, 2014). Las subunidades GluCl_α y GluCl_β pueden formar receptores homoméricos o heteroméricos en sistemas de expresión heteróloga lo cual permite comprender la farmacología de dichos receptores. Si bien se cree que el receptor nativo es un heteropentámero formado por subunidades α y β , muy poco se sabe sobre la estequiometría de las subunidades que lo conforman como así también sobre su farmacología. Para comprender los efectos moleculares de doxepinona sobre GluCl_s, se utilizó el modelo de receptor heteromérico GluCl_{α1/β}, que ha sido previamente expresado en células de mamífero y caracterizado en detalle. Células cotransfectadas con los cDNA de las dos subunidades salvajes GluCl_α y GluCl_β generan respuestas robustas tanto a glutamato como a IVM (Degani-Katzav et al., 2016).

Mediante registros de corrientes macroscópicas se caracterizaron funcionalmente los GluCl_s. Se encontró que células transfectadas para expresar receptores heteroméricos GluCl_{α1/β} generaban respuestas robustas a glutamato 3 mM. Estos resultados fueron similares a los reportados por otros autores en investigaciones previas (Degani-Katzav et al., 2016). Mediante el análisis del pico de corriente generado por glutamato en función del voltaje aplicado, se determinó que los GluCl_s presentan un comportamiento óhmico y carecen de una rectificación significativa.

Luego se evaluó si la doxepinona era capaz de activar los GluCl_s. La aplicación de doxepinona de manera individual no generó corrientes macroscópicas, indicando que dicha droga no es agonista del tipo de GluCl expresado en las células BOSC 23, una acción diferente a la generada por la IVM.

Posteriormente se estudiaron los efectos de la droga sobre las corrientes de GluCl_s. Para determinar si la doxepinona interacciona con el estado cerrado del receptor se llevó a cabo un protocolo de preincubación (+/-), y para determinar si interacciona con el estado abierto del receptor se realizó el protocolo de co-aplicación (-/+) (Gumilar y Bouzat, 2008). La preincubación de GluCl_s con doxepinona, antes de la activación de los receptores con su agonista, redujo significativamente la carga neta de la corriente, indicando que la doxepinona actúa como un inhibidor. El análisis de los parámetros de las corrientes macroscópicas, luego de la preincubación con la droga, mostró una leve reducción en el pico y un aumento significativo en la velocidad de decaimiento de la corriente, indicando que este último cambio gobierna la modulación negativa. Resultados similares fueron reportados para el insecticida Fipronil. Este se uniría al receptor GluCl de *A. gambiae* en un estado no conductor inhibiendo la activación del receptor generada por glutamato. Este modo de inhibición ha sido observado en otros LGICs selectivos a aniones como GABA_AR de invertebrados y GlyR de humanos (Atif et al., 2020).

Al aplicar doxepinona junto con glutamato sin preincubación (protocolo de co-aplicación -/+), los cambios en las corrientes fueron cualitativamente similares a los resultados obtenidos en el protocolo de preincubación, pero cuantitativamente menores. En conclusión, mediante los protocolos de preincubación y co-aplicación se determinó que doxepinona actúa sobre diferentes estados conformacionales de GluCl, estado cerrado y abierto. Sin embargo, la reducción en la carga neta como el aumento en la velocidad de desensibilización de la corriente fueron mayores cuando la droga se aplicó sobre los canales en estado cerrado (protocolo de preincubación).

La inhibición del receptor puede ser causada por antagonismo competitivo o no competitivo. Si la inhibición fuera consecuencia de un antagonismo competitivo, la doxepinona hubiera generado una reducción en el pico de corriente en lugar de un incremento en la velocidad de decaimiento de la misma. Además, los efectos generados por la co-aplicación de doxepinona con glutamato hubieran sido mayores a los observados en la preincubación, lo cual fue opuesto a los resultados obtenidos experimentalmente. Por lo tanto, los resultados obtenidos en ambos protocolos de aplicación de drogas no apoyan un antagonismo competitivo y sugieren una modulación alostérica.

El incremento en la velocidad de decaimiento de la corriente debido a la presencia de inhibidores alostéricos podría surgir por un aumento en la velocidad de desensibilización o por bloqueo de canal abierto con una velocidad de desbloqueo lenta (Gumilar y Bouzat, 2008). Dado que los decaimientos de las corrientes fueron ajustados con una función exponencial simple, se podría descartar un mecanismo de bloqueo rápido de canal abierto que conlleva un ajuste mediante dos componentes (Gumilar et al., 2003). Por lo tanto, la caracterización molecular de la doxepinona obtenida a partir de registros electrofisiológicos indica que dicha droga actúa como un modulador alostérico negativo (antagonista no competitivo) de GluCl_s.

La primera estructura tridimensional de un canal iónico activado por ligandos de eucariota fue el receptor homomérico GluCl α de *C. elegans* con IVM unida. Esto permitió conocer detalles de la estructura del sitio de unión de IVM y de glutamato (Wolstenholme, 2012). IVM se une a interfaces de subunidades en la periferia del TMD, próximo al lado extracelular de la membrana lipídica. Se ubica entre la hélice α M3 de la subunidad principal y la hélice α M1 de la subunidad complementaria, y hace contacto con la hélice α M2 y con el *loop* M2/M3. La unión de IVM a GluCl genera dos tipos de cambios conformacionales, primero una distorsión local del receptor en las proximidades del sitio de unión y luego un cambio conformacional global que lleva a transición desde el estado cerrado a abierto. Por otro lado, el agonista glutamato se une al sitio de unión del neurotransmisor localizado en el dominio extracelular entre subunidades (Hibbs y Gouaux, 2011). Futuros estudios combinando diversos receptores mutantes podrían ayudar a definir si la doxepinona es capaz de unirse al sitio de unión de la IVM.

Si bien la IVM y doxepinona comparten el mismo blanco molecular, estas moléculas no están relacionadas, son compuestos estructuralmente diferentes. La IVM es una lactona macrocíclica de alto peso molecular derivada de avermectinas (Ōmura, 2008) y la doxepinona es un núcleo tricíclico presente en una gran variedad de compuestos bioactivos. Estructuralmente, la doxepinona se caracteriza por la presencia de un sistema de anillos dibenzo-4-oxepanona. Cada anillo está conectado en una formación fusionada que no permite la rotación alrededor de las uniones carbono-carbono. Esta estructura única, junto con el tipo de grupos químicos presentes como así también su posición, definen las funcionalidades específicas de la doxepinona. La arquitectura hidrofóbica plana de estos compuestos heterocíclicos oxigenados brinda un comportamiento fisicoquímico marcadamente diferente en comparación a la IVM.

La estructura de la doxepinona se relaciona con los antidepresivos tricíclicos, en particular con la doxepina. La doxepina es una dibenzo[b,e]oxepina tricíclica con una amina terciaria que actúa inhibiendo la receptación de serotonina y norepinefrina en la sinapsis química. Se utiliza para el tratamiento de la depresión y ocasionalmente para tratar desórdenes de ansiedad e insomnio (Scoccia et al., 2017). Se ha reportado que los antidepresivos tricíclicos inhiben otros receptores *Cys-loop*, incluyendo receptores nAChR y 5-HT_{3A} de vertebrados (Gumilar et al., 2003; Gumilar y Bouzat, 2008). Resulta interesante que la acción molecular de la doxepina sobre el nAChR fue semejante a la de la doxepinona sobre GluCl. Se encontró que doxepina reduce el pico de corriente generada por el agonista e incrementa la velocidad de decaimiento de la corriente del nAChR muscular de ratón. Los efectos eran mayores cuando las células eran preincubadas con doxepina que cuando se aplicaba junto con el agonista (Gumilar et al., 2003). Un incremento en la desensibilización y/o un bloqueo de canal fueron los mecanismos propuestos para explicar los efectos macroscópicos de la doxepina sobre el nAChR (Gumilar et al., 2003). Si bien se ha demostrado previamente en el Laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular del INIBIBB que la doxepina disminuye levemente la velocidad de nado en *C. elegans*, el efecto fue significativamente menor comparado con el de la doxepinona (Scoccia et al., 2017). Se ha reportado que doxepina presenta actividad antihelmíntica contra la larva L3 del helminto intestinal *Ancylostoma ceylanicum*, revelando una acción antiparasitaria. Sin embargo, a diferencia de los ensayos en los cuales se utiliza a *C. elegans* para evaluar efectos rápidos de las drogas, los efectos fueron evaluados a largo plazo exponiendo a los nematodos parásitos 72 horas a la doxepina (Keiser et al., 2016).

La IVM es una de las drogas antiparasitarias mejor conocida y más utilizada tanto en medicina veterinaria como humana. Su gran uso ha generado la rápida selección de nematodos parásitos resistentes, es decir que son capaces de sobrevivir al tratamiento con la droga, y se ha convertido en un grave problema (Laing et al., 2017). La adquisición de resistencia afecta el control de nematodos parásitos del ganado y de animales domésticos, pero las preocupaciones se han incrementado debido a que la resistencia a IVM comenzó a involucrar parásitos humanos como *O. volvulus* (Laing et al., 2017). Los mecanismos asociados a la resistencia a IVM incluyen cambios en la secuencia y composición de GluCl, como así también en proteínas que regulan la permeabilidad de la membrana y uniones gap. Por otro lado, la resistencia a IVM ha sido asociada a un aumento en la expresión de la proteína transportadora de multi drogas P-gp, que está involucrada en la exclusión de drogas (Xu et al., 1998; Le Jambre et al., 1999; Sangster et al., 1999; Ardelli y Prichard, 2013; Ménez et al., 2016). Dado que IVM y doxepinona son compuestos estructuralmente diferentes, probablemente presenten diferentes actividades

asociadas a la P-gp, como así también diferentes sensibilidades en los diversos subtipos de GluCl. Por lo tanto, los descubrimientos planteados en este Capítulo de la Tesis ofrecen un nuevo soporte para el desarrollo de compuestos activos sobre GluCl que logren superar la resistencia a IVM y ser eficaces sobre diferentes especies de helmintos.

La elevada potencia de la IVM radica en su capacidad de actuar como agonista de GluCl aniónicos y mantener el canal iónico continuamente abierto, generando la hiperpolarización de células postsinápticas (Wolstenholme, 2012; Degani-Katzav et al., 2016). En este Capítulo se encontró que doxepinona presenta un efecto opuesto al de IVM, es decir, la inhibición de los GluCl emerge como un mecanismo de acción antihelmíntica. En concordancia con estos hallazgos, la inhibición de GluCl también ha sido propuesta como un mecanismo involucrado en la acción insecticida de picrotoxina, lindano y fipronil (Narahashi et al., 2010; Wolstenholme, 2012; Atif et al., 2020). Se ha demostrado que fipronil inhibe reversiblemente GluCl activados por glutamato presentes en *C. elegans* (Horoszok et al., 2001) y presentes en *Haemonchus contortus* pero de manera no reversible (Mccavera et al., 2009). También se ha visto que fipronil es efectivo para controlar nematodos que afectan el trigo, incrementando su rendimiento (Cui et al., 2017).

En conclusión, tanto un aumento como una reducción en la hiperpolarización mediada por GluCl podrían afectar la locomoción de los nematodos y el bombeo faríngeo. Es esencial conocer, en estudios posteriores, cómo las interacciones neuronales que gobiernan los comportamientos del nematodo se ven afectadas como resultado de una hiperpolarización reducida debido a la inhibición de los GluCl. Se propone a la doxepinona como un nuevo andamio con potencial actividad antihelmíntica, y la inhibición de los GluCl como un mecanismo de acción antihelmíntica de dicha droga.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES

Este trabajo de Tesis permitió identificar nuevos compuestos antihelmínticos y estudiar otros ya existentes utilizando a *C. elegans* como modelo de nematodo parásito. Hizo posible la descripción de sus efectos sobre los patrones de comportamiento y de sus bases moleculares.

En el **Capítulo 1** se determinó que *C. elegans* es sensible a la droga antihelmíntica befenio. Esta droga actúa a través de los L-AChRs y por lo tanto el nematodo no posee un subtipo específico B-AChR. Befenio actúa como agonista ortostérico y activa el L-AChRs de manera eficaz ya que realiza interacciones cation- π , requeridas para la activación, en muchas interfases del receptor. Además, actúa como bloqueador de canal abierto a concentraciones elevadas.

Befenio activa el nAChR muscular de mamífero, pero es un agonista muy débil. También se demostró que es un bloqueador potente del canal. Esta droga activaría un solo sitio ortostérico del receptor, en la interfase $\alpha 1/\epsilon$, lo cual explicaría su baja eficacia. Estos resultados confirman que befenio presenta mayor selectividad para activar nAChRs de nematodos.

Estos hallazgos revelaron detalles de los mecanismos de acción y selectividad de un antihelmíntico existente, el befenio. Esta información farmacológica es relevante para el desarrollo, al momento muy limitado, de nuevos fármacos.

En el **Capítulo 2** se demostró que timol, eugenol y carvacrol presentan actividad antihelmíntica a corto plazo, mediante parálisis muscular rápida de *C. elegans*, y a largo plazo mediante la inhibición irreversible de la eclosión de huevos.

Se determinó que el efecto paralizante de los terpenoides varía en función del estadio de desarrollo de los nematodos siendo las larvas L1 más sensibles que los adultos jóvenes.

La combinación de timol/levamisol fue la más efectiva en paralizar a *C. elegans* e inhibir la eclosión de huevos, siendo una buena estrategia para contrarrestar la resistencia.

Los L-AChRs y los receptores UNC-49 son los blancos moleculares involucrados en la parálisis generada por los terpenoides. Estos compuestos no son agonistas de los receptores, sino que actúan como inhibidores alostéricos.

Determinar propiedades antihelmínticas en compuestos químicos obtenidos a partir de especies vegetales, como es el caso de los terpenoides, propone una obtención de fármacos más sencilla, segura y de bajo costo. Teniendo en cuenta que las parasitosis afectan a las poblaciones más vulnerables y están muy ligadas a los problemas de pobreza, poder utilizar plantas para reducir las infestaciones es de gran importancia.

En el **Capítulo 3** se demostró que el compuesto sintético doxepinona es capaz de paralizar a *C. elegans* y que ejerce su acción a través de los GluCl α s, el blanco molecular de la IVM.

Al igual que sucede con IVM, la doxepinona reduce la velocidad de bombeo faríngeo y que dicho efecto estaría mediado por los GluCl α s.

Doxepinona no es un agonista del receptor heteromérico GluCl α 1/GluCl β de *C. elegans* ya que no es capaz de activarlo. Actúa como un inhibidor alostérico de los GluCl α s. Se propuso la inhibición del GluCl como un nuevo mecanismo antihelmíntico.

Los productos naturales brindan una diversidad de estructuras químicas muy útil como recurso de inspiración para el descubrimiento de drogas y la obtención de análogos. Los compuestos sintéticos generados en función de estructuras químicas privilegiadas presentes en compuestos biológicamente activos, como la doxepinona, ponen de manifiesto una estrategia de síntesis beneficiosa y transferible a la industria farmacológica.

Las parasitosis pertenecen al grupo de enfermedades desatendidas que están directamente relacionadas con la pobreza, y afectan principalmente a los niños. Por lo tanto, promover el estudio y desarrollo de compuestos químicos antihelmínticos es muy importante para lograr un crecimiento y desarrollo infantil adecuado. Además de la disponibilidad de fármacos, es importante fomentar la educación sanitaria y la mejora de las condiciones de saneamiento para lograr una mejor calidad de vida de la población en general.

Mediante diferentes estrategias y utilizando un modelo de nematodo parasitario, este trabajo de Tesis aporta nuevas herramientas y conocimientos para el tan requerido desarrollo de fármacos antiparasitarios.

ABREVIATURAS

- 5-HT: serotonina (5-hidroxitriptamina)
- 5-HT₂: receptor de serotonina tipo 2
- 5-HT_{3A}: receptor de serotonina tipo 3A
- 5-HT₃: receptor de serotonina tipo 3
- ACh: acetilcolina
- AChBP: *Acetylcholine Binding Protein*
- nAChR: receptor de acetilcolina nicotínico
- BBE: mejor energía de unión
- B-nAChR: receptor nicotínico sensible a befenio
- BOSC: línea celular humana derivada de la línea HEK
- C: estado cerrado del canal
- C₁: duración media del componente de estado cerrado 1
- C₂: duración media del componente de estado cerrado 2
- cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario
- CGC: *Caenorhabditis Genetics Center*
- CI: índice de combinación de drogas
- D: estado desensibilizado del canal
- DMEM: *Dulbecco Modified Eagle Medium*
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNC: cordón nervioso dorsal
- doxepinona: dibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ona
- DTT: ditioneitol
- EC₅₀: dosis efectiva 50
- ECD: dominio extracelular
- ECS: solución extracelular
- GABA: ácido γ -aminobutírico
- GABA_AR: receptor de ácido γ -aminobutírico tipo A
- GABA_CR: receptor de ácido γ -aminobutírico tipo C
- GABAR: receptor de ácido γ -aminobutírico
- GFP: proteína fluorescente verde

GluCl: canal de cloruro activado por glutamato

GlyR: receptor de glicina

HEK: células embrionarias humanas de riñón

IC₅₀: concentración inhibitoria media máxima

ICD: dominio intracelular

ICS: solución intracelular

I_{peak}: pico de corriente

I_∞: corriente en estado estacionario

IVM: ivermectina

k_{+b}: velocidad de bloqueo del canal

K₀: constante de equilibrio entre estado abierto y cerrado

K₁: constante de equilibrio entre estado cerrado y desensibilizado

K₂: constante de equilibrio entre estado desensibilizado y abierto

k_{-b}: velocidad de desbloqueo del canal

L1: estadio larval 1

L2: estadio larval 2

L3: estadio larval 3

L4: estadio larval 4

L-AChR: receptor de acetilcolina nicotínico sensible a levamisol

LB: *Lysogeny Broth*

LGICs: canales iónicos activados por ligandos

M1: primer segmento transmembranal

M2: segundo segmento transmembranal

M3: tercer segmento transmembranal

M4: cuarto segmento transmembranal

MOD-1: receptor ionotrópico de serotonina

N-AChR: receptor de acetilcolina sensible a nicotina

nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina

NAM: modulador alostérico negativo

NGM: *nematode growth medium*

NMJ: unión neuromuscular

O: estado abierto del canal

O_1 : duración media del componente de estado abierto

OB: estado bloqueado del canal

OP50: cepa de *Escherichia coli*

PAM: modulador alostérico positivo

PDB: base de datos de proteínas

P-gp: glicoproteína P

PZE: piperazina

R*: estado abierto

R: estado cerrado

RBL: longitud relativa del cuerpo

RDL_{ac}: receptor de GABA *Drosophila melanogaster*

SDS: dodecilsulfato sódico

SNC: sistema nervioso central

t_{20-80} : tiempo en que la corriente pasa de un 20 % a 80 % de su valor máximo

TMD: dominio transmembrana

VNC: cordón nervioso ventral

α : velocidad de cierre del canal

α_7 : receptor nicotínico alfa 7

β : velocidad de apertura del canal

τ_d : constante de decaimiento de corrientes macroscópicas

τ_{crit} : tiempo crítico para definir *bursts*

τ_{fast} : constante de tiempo de decaimiento rápida

τ_{slow} : constante de tiempo de decaimiento lenta

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Rahman F. H., Alaniz N. M. y Saleh M. A. (2013). *Nematicidal activity of terpenoids*. Journal of Environmental Science and Health (Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes) 48:16–22.

Abongwa M., Buxton S. K., Courtot E., Charvet C. L., Neveu C., McCoy C. J., Verma S., Robertson A. P. y Martin R. J. (2016). *Pharmacological profile of Ascaris suum ACR-16, a new homomeric nicotinic acetylcholine receptor widely distributed in Ascaris tissues*. Br J Pharmacol 173:2463–2477.

Akk G. y Steinbach J. H. (2003). *Activation and block of mouse muscle-type nicotinic receptors by tetraethylammonium*. J Physiol 551:155–168.

Almedom R. B., Liewald J. F., Hernando G., Schultheis C., Rayes D., Pan J., Schedletzky T., Hutter H., Bouzat C. y Gottschalk A. (2009). *An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse*. EMBO J 28:2636-2649.

Altun Z. F. y Hall D. H. (2009a). *Introduction in WormAtlas*.

Altun Z. F. y Hall D. H. (2009b). *Muscle system, Introduction in WormAtlas*.

Altun Z. F. y Hall D. H. (2011). *Nervous system, general description in WormAtlas*.

Andersen N. D., Nielsen B. E., Corradi J., Tolosa M. F., Feuerbach D., Arias H. R. y Bouzat C. (2016). *Exploring the positive allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic receptors from a single-channel perspective*. Neuropharmacology 107:189-200.

André W. P. P., Cavalcante G. S., Ribeiro W. L. C., Dos Santos J. M. L., Macedo I. T. F., De Paula H. C. B., De Moraes S. M., De Melo J. V. y Bevilaqua C. M. L. (2017). *Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice*. Rev Bras Parasitol Vet 26:323–330.

André W. P. P., Ribeiro W. L. C., Cavalcante G. S., Santos J. M. L. do., Macedo I. T. F., Paula H. C. B. d., de Freitas R. M., de Moraes S. M., Melo J. V. d. y Bevilaqua C. M. L. (2016). *Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice*. Vet Parasitol 218:52–58.

Angstadt J. D., Donmoyer, J. E. y Stretton A. O. (1989). *Retrovesicular ganglion of the nematode Ascaris*. J Comp Neurol 284:374–388.

Ardelli B. F. y Prichard R. K. (2013). *Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of Caenorhabditis elegans to ivermectin*. Vet Parasitol 191:264–275.

Atif M., Lynch J. W. y Keramidias A. (2020). *The effects of insecticides on two splice variants of the glutamate-gated chloride channel receptor of the major malaria vector, Anopheles gambiae*. Br J Pharmacol 177:175–187.

- Ballivet M., Alliod C., Bertrand S. y Bertrand D. (1996). *Nicotinic acetylcholine receptors in the nematode Caenorhabditis elegans*. J Mol Biol 258:261–269.
- Bamber B. A., Beg A. A., Twyman R. E. y Jorgensen E. M. (1999). *The Caenorhabditis elegans unc-49 locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor*. J Neurosci 19:5348-5359.
- Bamber B. A., Richmond J. E., Otto J. F. y Jorgensen E. M. (2005). *The composition of the GABA receptor at the Caenorhabditis elegans neuromuscular junction*. Br J Pharmacol 144:502-509.
- Bamber B. A., Twyman R. E. y Jorgensen E. M. (2003). *Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in C. elegans*. Br J Pharmacol 138:883-893.
- Bartos M., Corradi J. y Bouzat C. (2009). *Structural Basis of Activation of Cys-Loop Receptors: the Extracellular Transmembrane Interface as a Coupling Region*. Mol Neurobiol 40:236-52.
- Batiha G. E-S., Alkazmi L. M., Wasef L. G., Beshbishy A. M., Nadwa E. H., Rashwan E. K. (2020). *Syzygium aromaticum L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities*. Biomolecules 10:202.
- Bertrand D. y Gopalakrishnan M. (2007). *Allosteric Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors*. Biochem Pharmacol 74:1155-1163.
- Bianchi L. y Driscoll M. (2006). *Culture of embryonic C. elegans cells for electrophysiological and pharmacological analyses*. WormBook, ed. The C. elegans Research Community.
- 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*. Proc Natl Acad Sci USA 109:9173–9178.
- Bird A. F. y Bird J. (1991). *The Exoskeleton*. In *The structure of nematodes*. (ed. A.F. Bird and J. Bird). chap. 3, pp. 44-74. Academic Press, San Diego.
- Blanchard A., Guégnard F., Charvet C. L., Crisford A., Courtot E., Sauv  C., Harmache A., Duguet T., O'Connor V., Castagnone-Sereno P., Reaves B., Wolstenholme A. J., Beech R. N., Holden-Dye L. y Neveu C. (2018). *Deciphering the molecular determinants of cholinergic anthelmintic sensitivity in nematodes: When novel functional validation approaches highlight major differences between the model Caenorhabditis elegans and parasitic species*. PLoS Pathog 14:e1006996.
- Bondarenko V., Mowrey D. D., Tillman T. S., Seyoum E., Xu Y. y Tang P. (2013). *NMR structures of the human $\alpha 7$ nAChR transmembrane domain and associated anesthetic binding sites*. Biochim Biophys Acta 1838:1389–1395.
- Boulin T., Fauvin A., Charvet C. L., Cortet J., Cabaret J., Bessereau J. L. y Neveu C. (2011). *Functional reconstitution of Haemonchus contortus acetylcholine receptors in Xenopus oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance*. Br J Pharmacol 164:1421–1432.
- Boulin T., Gielen M., Richmond J. E., Williams D. C., Paoletti P. y Bessereau J. L. (2008). *Eight genes are required for functional reconstitution of the Caenorhabditis elegans levamisole-sensitive acetylcholine receptor*. Proc Natl Acad Sci USA 105:18590–18595.

- Bouzat C. (2012). *New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors*. J Physiol Paris 106:23–33.
- Bouzat C. y Mukhtasimova N. (2018). *The nicotinic acetylcholine receptor as a molecular machine for neuromuscular transmission*. Curr Opin Physiol 4:40–48.
- Bouzat C. y Sine S. M. (2018). *Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level*. Br J Pharmacol 175:1789–1804.
- 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*. J Neurosci 28:7808–7819.
- Bouzat C., Bren N. y Sine S. M. (1994). *Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors*. Neuron 13:1395-1402.
- Bouzat C., Gumilar F., Esandi C. y Sine S. M. (2002). *Subunit-Selective Contribution to Channel Gating of the M4 Domain of the Nicotinic Receptor*. Biophys J 82:1920–1929.
- Bouzat C., Barrantes F. y Sine S. (2000). *Nicotinic Receptor Fourth Transmembrane Domain. Hydrogen Bonding by Conserved Threonine Contributes to Channel Gating Kinetics*. J Gen Physiol 115:663–672.
- Brejč K., van Dijk W. J., Klaassen R. V., Schuurmans M., van Der O. J., Smit A. B. y Sixma T. K. (2001). *Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors*. Nature 411:269-276.
- Brenner S. (1974). *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics 77:71-94.
- Brockie P. J. y Maricq A. V. (2006). *Ionotropic glutamate receptors: genetics, behavior and electrophysiology*. WormBook 1–16.
- Brown L. A., Jones A. K., Buckingham S. D., Mee C. J. y Sattelle D. B. (2006). *Contributions from Caenorhabditis elegans functional genetics to antiparasitic drug target identification and validation: Nicotinic acetylcholine receptors, a case study*. Int J Parasitol 36:617–624.
- Buckingham S. D. y Sattelle D. B. (2009). *Fast, automated measurement of nematode swimming (thrashing) without morphometry*. BMC Neurosci 10:84.
- Burrows R. B. (1958). *The anthelmintic effect of bephenium on Ancylostoma caninum*. J Parasitol 44:607–610.
- Bustos J. F. G., Sleeb B. E. y Gasser R. B. (2019). *An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals*. Parasit Vectors 1–22.
- Buxton S. K., Charvet C. L., Neveu C., Cabaret J., Cortet J., Peineau N., Abongwa M., Courtot E., Robertson A. P. y Martin R. J. (2014). *Investigation of Acetylcholine Receptor Diversity in a Nematode Parasite Leads to Characterization of Tribendimidine- and Derquantel-Sensitive nAChRs*. PLoS Pathog 10(1).
- Caldicott I. M., Larsen P. L. y Riddle D. L. (1994). *In: Cell biology: a laboratory handbook*. (San Diego: Academic Press), pp. 389.

- Campbell W. C. (2012). *History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents*. *Curr Pharm Biotechnol* 13:853–865.
- Carroll S. B., Grenier J. K. y Weatherbee S. D. (2004). *From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design*. 2nd edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
- Celie P. H., van Rossum-Fikkert S. E., van Dijk W. J., Brejc K., Smit A. B. y Sixma T. K. (2004). *Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures*. *Neuron* 41:907–914.
- Changeux J. P. y Edelstein S. (2001). *Allosteric Mechanism in Normal and Pathological Nicotinic Acetylcholine Receptors*. *Current Opinion in Neurobiology* 11:369-377.
- Charvet C. L., Guégnard F., Courtot E., Cortet J. y Neveu C. (2018). *Nicotine-sensitive acetylcholine receptors are relevant pharmacological targets for the control of multidrug resistant parasitic nematodes*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8:540–549.
- Charvet C. L., Robertson A. P., Cabaret J., Martin R. J. y Neveu C. (2012). *Selective effect of the anthelmintic buphenium on *Haemonchus contortus* levamisole-sensitive acetylcholine receptors*. *Invert Neurosci* 12:43–51.
- Chase D. L. y Koelle M. R. (2007). *Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans**. *WormBook: The Online Review of *C. Elegans* Biology*, 1–15.
- Chen I-S. y Kubo Y. (2018). *Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels, and receptors by ivermectin*. *J Physiol* 596:1833–1845.
- Chou T. C. (2006). *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. *Pharmacol Rev* 58:621–681.
- Chou T. C. y Martin N. (2005). *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values*. ComboSyn Inc, Paramus: 2005.
- Chou T. C. y Talalay P. (1984). *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. *Adv Enzyme Regul* 22:27–55.
- Choudhary S., Tipton J. G., Abongwa M., Brewer M. T., Chelladurai J. J., Musselman N., Martin, R. J. y Robertson A. P. (2019). *Pharmacological characterization of a homomeric nicotinic acetylcholine receptor formed by *Ancylostoma caninum* ACR-16*. *Invert Neurosci* 19(4).
- Christensen M., Estevez A., Yin X., Fox R., Morrison R., McDonnell M., Gleason C., Miller D. M. III y Strange K. (2002). *A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells*. *Neuron* 33:503-514.
- Copp F. C., Standen O. D., Scarnell J., Rawes D. A. y Burrows R. B. (1958). *A new series of anthelmintics*. *Nature* 181:183.
- Corradi J. y Bouzat C. (2016). *Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: implications for drug discovery*. *Mol Pharmacol* 90:288–299.
- Corradi J., Gumilar F. y Bouzat C. (2009). *Single-Channel Kinetic Analysis for Activation and Desensitization of Homomeric 5-HT3A Receptors*. *Biophys J* 97:1335-1345.

- Corradi J., Spitzmaul G., De Rosa M. J., Costabel M. y Bouzat C. (2007). *Role of Pairwise Interactions between M1 and M2 Domains of the Nicotinic Receptor in Channel Gating*. *Biophys J* 92:76–86.
- Corsi A. K., Wightman B. y Chalfie M. (2015). *A Transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans*. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–31.
- Cox G. N., Kusch M. y Edgar R. S. (1981). *Cuticle of C. elegans: Its isolation and partial characterization*. *J. Cell Biol* 90:7-17.
- Cui J., Huang W. y Peng H. (2017). *Efficacy Evaluation of Seed-Coating Compounds Against Cereal Cyst Nematodes and Root Lesion Nematodes on Wheat*. *Plant Disease* 101:428–433.
- Culetto E., Baylis H. A., Richmond J. E., Jones A. K., Fleming J. T., Squire M. D., Lewis J. A. y Sattelle D. B. (2004). *The Caenorhabditis elegans unc-63 gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit*. *J Biol Chem* 279:42476-42483.
- Cully D. F., Paress P. S., Liu K. K., Schaeffer J. M. y Arena J. P. (1996). *Identification of a Drosophila melanogaster glutamate gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin*. *J Biol Chem* 271:20187–20191.
- Cully D. F., Vassilatis D. K., Liu K. K., Paress P. S., Van Der Ploeg L. H. T., Schaeffer J. M. y Arena J. P. (1994). *Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371:707–711.
- Davis R. E. (1998). *Neurophysiology of glutamatergic signalling and anthelmintic action in Ascaris suum: pharmacological evidence for a kainate receptor*. *Parasitology* 116:471–486.
- De Bono M. (2003) *Molecular approaches to aggregation behavior and social attachment*. *J Neurobiol* 54:78-92.
- Degani-Katzav N., Gortler R., Gorodetzki L. y Paas Y. (2016). *Subunit stoichiometry and arrangement in a heteromeric glutamate-gated chloride channel*. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E644–E653.
- Dempsey C. M., Mackenzie S. M., Gargus A., Blanco G. y Sze J. Y. (2005). *Serotonin (5HT), Fluoxetine, Imipramine and Dopamine Target Distinct 5HT Receptor Signaling to Modulate Caenorhabditis elegans Egg-Laying Behavior*. *Genetics* 169:1425–1436.
- Dent J. A, Smith M. M., Vassilatis D. K. y Avery L. (2000). *The genetics of ivermectin resistance in Caenorhabditis elegans*. *PNAS* 97:2674–2679.
- Dent J. A., Davis M. W. y Avery L. (1997). *avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 16:5867–5879.
- Dilger J. P. y Liu Y. (1992). *Desensitization of Acetylcholine Receptors in BC3H-1 Cells*. *Pflugers Arch* 420:479-485.
- Dixon S. J. y Roy P. J. (2005). *Muscle arm development in Caenorhabditis elegans*. *Development* 132: 3079-3092.

- Dougherty D. A. (2007). *Cation- π interactions involving aromatic amino acids*. J Nutr 137(6 Suppl 1):1504S–1508S, discussion 1516S–1517S.
- Duguet T. B., Charvet C. L., Forrester S. G., Wever C. M., Dent J. A., Neveu C. y Beech R. N. (2016). *Recent Duplication and Functional Divergence in Parasitic Nematode Levamisole-Sensitive Acetylcholine Receptors*. PLoS Negl Trop Dis 10:1–26.
- Enan E. E. (2005). *Molecular response of Drosophila melanogaster tyramine receptor cascade to plant essential oils*. Insect Biochem Mol Biol 35:309–321.
- Evans B. E., Rittle K. E., Bock M. G., DiPardo R. M., Freidinger R. M., Whitter W. L., Lundell G. F., Veber D. F., Anderson P. S., Chang R. S. L., Lotti V. J., Cerino D. J., Chen T. B., Kling P. J., Kunkel K. A., Springer J. P. y Hirshfield J. (1988). *Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystinin antagonists*. J Med Chem 31:2235–2246.
- Fauvin A., Charvet C., Issouf M., Cortet J., Cabaret J. y Neveu C. (2010). *cDNA-AFLP analysis in levamisole-resistant Haemonchus contortus reveals alternative splicing in a nicotinic acetylcholine receptor subunit*. Mol Biochem Parasitol 170:105-107.
- Ferreira L. E., Benincasa B. I., Fachin A. L., França S. C., Contini S. S. H. T., Chagas A. C. S. y Beleboni R. O. (2016). *Thymus vulgaris L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against Haemonchus contortus from sheep*. Vet Parasitol 228:70–76.
- Ferrell J. A. (1914). *The Rural School and Hookworm Disease*. 43 p.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. y Mello C. C. (1998). *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature 391:806-811.
- Fleming J. T., Squire M. D., Barnes T. M., Torno C., Matsuda K., Ahnn J., Fire A., Sulston J. E., Barnard E. A., Sattelle D. B. y Lewis J. A. (1997). *Caenorhabditis elegans levamisole resistance genes lev-1, unc-29, and unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits*. J Neurosci 17:5843-5857.
- Francis M. M., Evans S. P., Jensen M., Madsen D. M., Mancuso J., Norman K. R. y Maricq A. V. (2005). *The Ror receptor tyrosine kinase CAM-1 is required for ACR-16-mediated synaptic transmission at the C. elegans neuromuscular junction*. Neuron 46:581-594.
- Gao F., Bren N., Burghardt T. P., Hansen S., Henchman R. H., Taylor P., McCammon J. A., Sine S. M. (2005). *Agonist-mediated conformational changes in acetylcholine-binding protein revealed by simulation and intrinsic tryptophan fluorescence*. J Biol Chem 280:8443–8451.
- Geary T. G., Sakanari J. A. y Caffrey C. R. (2015). *Anthelmintic Drug Discovery: Into the Future*. J Parasitol 101:125–133.
- Geary T. G., Sangster N. C. y Thompson D. P. (1999). *Frontiers in anthelmintic pharmacology*. Vet Parasitol 84:275–295.
- Gottschalk A., Almedom R. B., Schedletzky T., Anderson S. D., Yates J. R. III y Schafer W. R. (2005). *Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in Caenorhabditis elegans*. EMBO J 24:2566–2578.
- Green W. N. y Wanamaker C. P. (1997). *The role of the cystine loop in acetylcholine receptor assembly*. J Biol Chem 272:20945– 20953.

- Grutter T., De Carvalho L. P., Dufresne V., Taly A., Edelstein S. J. y Changeux J. P. (2005). *Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels*. Proc Natl Acad Sci U S A 102:18207–18212.
- Gumilar F. y Bouzat C. (2008). *Tricyclic antidepressants inhibit homomeric Cys-loop receptors by acting at different conformational states*. Eur J Pharmacol 584:30–39.
- Gumilar F., Arias H. R., Spitzmaul G. y Bouzat C. (2003). *Molecular mechanisms of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants*. Neuropharmacology 45:964–976.
- Gurel 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 192:1359–1371.
- Hall D. y Altun Z. (2008). *C. elegans Atlas*. <http://www.wormatlas.org>.
- Hall Z. W. y Sanes J. R. (1993). *Synaptic structure and development: The neuromuscular junction*. Cell 72:99-121.
- Hamdan F. F., Ungrin M. D., Abramovitz M. y Ribeiro P. (1999). *Characterization of a novel serotonin receptor from Caenorhabditis elegans: cloning and expression of two splice variants*. J Neurochem 72:1372–1383.
- Harrow I. D. y Gration K. A. F. (1985). *Mode of action of the anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole in the muscle cell membrane of the nematode Ascaris suum*. Pestic Sci 16:662–672.
- Hernando G. y Bouzat C. (2014). *Caenorhabditis elegans neuromuscular junction: GABA receptors and ivermectin action*. PLoS ONE 9:e95072.
- Hernando G., Bergé I., Rayes D. y Bouzat C. (2012). *Contribution of subunits to Caenorhabditis elegans levamisole-sensitive nicotinic receptor function*. Mol Pharmacol 82:550–560.
- Herndon L. A., Lints R. y Hall D. H. (2010). *Glossary F en WormAtlas*.
- Herndon L. A., Schmeissner P. J., Dudaronek J. M., Brown P. A., Listner K. M., Sakano Y., Paupard M. C., Hall D. H. y Driscoll M. (2002). *Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing C. elegans*. Nature 419: 808-814.
- Hibbs R. E. y Gouaux E. (2011). *Principles of activation and permeation in an anion selective Cys-loop receptor*. Nature 474:54–60.
- 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 alpha7 nicotinic acetylcholine receptor*. EMBO J 28:3040–3051.
- Hierro I., Valero A., Pérez P., González P., Cabo M. M., Montilla M. P. y Navarro M. C. (2004). *Action of different monoterpene compounds against Anisakis simplex s.l. L3 larvae*. Phytomedicine 11:77–82.
- Hilf R. J. C. y Dutzler R. *X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel*. (2008). Nature 452: 375-379.
- Hill R. W., Wyse G. A. y Anderson M. (2006). Fisiología Animal. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid, España.

- Hobson R. J., Geng J., Gray A. D. y Komuniecki R. W. (2003). *SER-7b, a constitutively active Galphas coupled 5-HT7-like receptor expressed in the Caenorhabditis elegans M4 pharyngeal motorneuron*. J Neurochem 87:22–29.
- Holden-Dye L. y Walker R. J. (2007). *Anthelmintic drugs*. WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology 44:1–13.
- Holden-Dye L. y Walker R.J. (2014). *Anthelmintic drugs and nematicides: studies in Caenorhabditis elegans*. WormBook, ed. The C. elegans Research Community.
- Horoszok L., Raymond V., Sattelle D. B. y Wolstenholme A. J. (2001). *GLC-3 : a novel fipronil and BIDN-sensitive , but picrotoxinin- insensitive , L-glutamate-gated chloride channel subunit from Caenorhabditis elegans*. Br J Pharmacol 132:1247–1254.
- Holden-Dye L., Joyner M., O’Connor V. y Walker R. J. (2013). *Nicotinic acetylcholine receptors: A comparison of the nAChRs of Caenorhabditis elegans and parasitic nematodes*. Parasitol Int 62:606-615.
- Iturriaga-Vásquez P., Alzate-Morales J., Bermudez I., Varas R. y Reyes-Parada M. (2015). *Multiple binding sites in the nicotinic acetylcholine receptors: An opportunity for polypharmacology*. Pharmacol Res 101:9–17.
- Jackson M. B. (1992). *Ion Channels. Single-Channel Analysis*. Methods Enzymol 207:729-746.
- Johnson C. D. y Stretton A. O. (1985). *Localization of choline acetyltransferase within identified motoneurons of the nematode Ascaris*. J Neurosci 5:1984–1992.
- Johnson C. D. y Stretton A. O. (1987). *GABA-immunoreactivity in inhibitory motor neurons of the nematode Ascaris*. J Neurosci 7:223–235.
- Jones A. K. y Sattelle D. B. (2008). *The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Invert Neurosci 8:41–47.
- Jones A. K., Buckingham S. D. y Sattelle D. B. (2005). *Chemistry-to-gene screens in Caenorhabditis elegans*. Nat Rev Drug Discov 4:321–330.
- Jones A. K., Davis P., Hodgkin J. y Sattelle D. B. (2007). *The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode Caenorhabditis elegans: An update on nomenclature*. Invert Neurosci 7:129–131.
- Juárez M. M. y Rajal V. B. (2013). *Parasitosis intestinales en Argentina: Principales agentes causales encontrados en la población y en el ambiente*. Rev Argent Microbiol 45:191–204.
- Kaplan R. M. (2004). *Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report*. Trends Parasitol 20:477–481.
- Kaplan R. M., Storey B. E., Vidyashankar A. N., Bissinger B. W., Mitchell S. M., Howell S. B., Mason M. E., Lee M. D., Pedroso A. A., Akashe A. y Skrypec D. J. (2014). *Antiparasitic efficacy of a novel plant-based functional food using an Ascaris suum model in pigs*. Acta Tropica 139:15–22.
- Katiki L. M., Barbieri A. M. E., Araujo R. C., Verissimo C. J., Louvandini H. y Ferreira J. F. S. (2017). *Synergistic interaction of ten essential oils against Haemonchus contortus in vitro*. Vet Parasitol 243:47:51.

- Keiser J., Panic G., Adelfio R., Cowan N., Vargas M. y Scandale I. (2016). *Evaluation of an FDA approved library against laboratory models of human intestinal nematode infections*. Parasit Vectors 9:1–10.
- Komuniecki R., Law W. J., Jex A., Geldhof P., Gray J., Bamber, B. y Gasser R. B. (2012). *Monoaminergic signalling as a target for anthelmintic drug discovery: receptor conservation among the free-living and parasitic nematodes*. Mol Biochem Parasitol 183:1–7.
- Laing R., Gillan V. y Devaney E. (2017). *Ivermectin – Old Drug , New Tricks ?*. Trends Parasitol 33:463–472.
- Lamson P. D. y Ward C. B. (1932). *The chemotherapy of helminth infestations*. J Parasitol 18: 173–199.
- 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*. Mol Pharmacol 87:87-95.
- Lanusse C., Alvarez L. y Lifschitz A. (2014). *Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants*. Vet Parasitol 204:18–33.
- Lanusse C., Canton C., Virkel G., Alvarez L., Costa-junior L. y Lifschitz A. (2018). *Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants*. Trends Parasitol.
- Law R. J., Henchman R. H., McCammon J. A. (2005). *A gating mechanism proposed from a simulation of a human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A 102:6813–6818.
- Le Jambre L. F., Lenane I. J. y Wardrop A. J. (1999). *A hybridization technique to identify anthelmintic resistance genes in Haemonchus*. Int J Parasitol 29:1979–1985.
- Lei J., Leser M. y Enan E. (2010). *Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of Caenorhabditis elegans*. Biochem Pharmacol 79:1062–1071.
- Levandoski M. M., Robertson A. P., Kuiper S., Qian H. y Martin R. J. (2005). *Single-channel properties of N- and L-subtypes of acetylcholine receptor in Ascaris suum*. Int J Parasitol 35:925–934.
- Lewis J. A., Wu C. -H., Berg H. y Levine J. H. (1980). *The genetics of levamisole resistance in the nematode Caenorhabditis elegans*. Genetics 95:905-28
- Li C. (2005). *The ever-expanding neuropeptide gene families in the nematode Caenorhabditis elegans*. Parasitology 131:S109–S127.
- Li P., Slimko E. M. y Lester H. A. (2002). *Selective elimination of glutamate activation and introduction of fluorescent proteins into a Caenorhabditis elegans chloride channel*. FEBS Lett. 528:77–82.
- Lints R. y Hall D. H. (2009). *The cuticle* en WormAtlas.
- Lozon Y., Sultan A., Lansdell S. J., Prytkova T., Sadek B., Yang K. H. S., Howarth F. C., Millar N. S. y Oz M. (2016). *Inhibition of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by cyclic monoterpene carveol*. Eur J Pharmacol 776:44–51.

- Lynagh T. y Lynch J. W. (2012). *Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors*. Trends Pharmacol Sci 33:432–441.
- Lynagh T., Cromer B. A., Dufour V. y Laube B. (2014). *Comparative pharmacology of flatworm and roundworm glutamate-gated chloride channels: Implications for potential anthelmintics*. Int J Parasitol 4:244–255.
- Manabe A., Nakayama S. y Sakamoto K. (1987). *Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes*. Jpn J Pharmacol 44:77 – 84.
- Martin R. J. (1985). *Gamma-Aminobutyric acid- and piperazine-activated single-channel currents from Ascaris suum body muscle*. Br J Pharmacol 84:445-461.
- Martin R. J. (1996). *An electrophysiological preparation of Ascaris suum pharyngeal muscle reveals a glutamate-gated chloride channel sensitive to the avermectin analogue, milbemycin D*. Parasitology 112 (Pt 2):247-252.
- Martin R. J., Clark C. L., Trailović S. M., Robertson A. P. (2004). *Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in Ascaris*. Int J Parasitol 34:1083-1090.
- Martin R. J., Valkanov M. A., Dale V. M. E., Robertson A. P. y Murray I. (1996). *Electrophysiology of Ascaris muscle and anti-nematodal drug action*. Parasitol 113:S137–S156.
- Mccavera S., Rogers A. T., Yates D. M., Woods D. J. y Wolstenholme A. J. (2009). *An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode Haemonchus contortus*. Mol Pharmacol 75:1347–1355.
- Ménez C., Alberich M., Kansoh D., Blanchard A. y Lespine A. (2016). *Acquired tolerance to ivermectin and moxidectin after drug selection pressure in the nematode Caenorhabditis elegans*. Antimicrob Agents Chemother 60:4809–4819.
- Meyers J. I., Gray M., Kuklinski W., Johnson L. B., Snow C. D., Black W. C., Partin K. M. y Foy B. D. (2015). *Characterization of the target of ivermectin, the glutamate-gated chloride channel, from Anopheles gambiae*. J Exp Biol 218:1478–1486.
- Miller P. S. y Smart T. G. (2010). *Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors*. Trends Pharmacol Sci 31:161–174.
- Moghrovyan A., Sahakyan N., Babayan A., Chichoyan N., Petrosyan M. y Trchounian A. (2019). *Essential Oil and Ethanol Extract of Oregano (Origanum vulgare L.) from Armenian Flora as a Natural Source of Terpenes, Flavonoids and other Phytochemicals with Antiradical, Antioxidant, Metal Chelating, Tyrosinase Inhibitory and Antibacterial Activity*. Curr Pharm Des 25:1809-1816.
- Mongan N. P., Baylis H. A., Adcock C., Smith G. R., Sansom M. S. y Sattelle D. B. (1998). *An extensive and diverse gene family of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits in Caenorhabditis elegans*. Receptors Channels 6:213-228.
- Morales-Perez C. L., Noviello C. M. y Hibbs R. E. (2016). *X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor*. Nature 538:411-415.

- Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S. y Olson A. J. (2009). *AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility*. J Comput Chem 30:2785–2791.
- 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 459:451–454.
- Narahashi T., Zhao X., Ikeda T., Salgado V. L. y Yeh J. Z. (2010). *Glutamate activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals*. Pestic Biochem Physiol 97:149-152.
- Neher E. y Steinbach J. H. (1978). *Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels*. J Physiol 277:153-176.
- Nemecz A., Prevost M. S., Menny A. y Corringer P-J. (2016). *Emerging molecular mechanisms of signal transduction in pentameric ligated-gated ion channels*. Neuron 90:452-470.
- Neveu C., Charvet C. L., Fauvin A., Cortet J., Beech R. N. y Cabaret J. (2010). *Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance*. Pharmacogenet Genomics 20:414-425.
- Olde B. y McCombie W. R. (1997). *Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from Caenorhabditis elegans*. J Mol Neurosci 8, 53–62.
- Ōmura S. (2008). *Ivermectin: 25 years and still going strong*. Int J Antimicrob Agents 31:91–98.
- Page A. P., Stepek G., Winter A. D. y Pertab D. (2014). *Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target?* Int J Parasitol 4:133–141.
- Papke R. L. y Porter Papke J. K. (2002). *Comparative pharmacology of rat and human $\alpha 7$ nAChR conducted with net charge analysis*. Br J Pharmacol 137:49-61.
- Pear W. S., Nolan G. P., Scott M. L. y Baltimore D. (1993). *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection*. Proc Natl Acad Sci USA 90: 8392–8396.
- Pemberton D. J., Franks C. J., Walker R. J. y Holden-Dye, L. (2001). *Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wildtype and mutant Caenorhabditis elegans delineates the role of the subunit GluCl-2 in the function of the native receptor*. Mol Pharmacol 59:1037-1043.
- Politz S. M. y Philipp M. (1992). *Caenorhabditis elegans as a model for parasitic nematodes: a focus on the Cuticle*. Parasitol Today 8:6-12.
- Post M. R., Tender G. S., Lester H. A. y Dougherty D. A. (2017). *Secondary ammonium agonists make dual cation-p interactions in $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors*. eNeuro 4:e0032-17.
- 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 Biochem Mol Biol 55:19–25.
- Priestley C. M., Williamson E. M., Wafford K. A. y Sattelle D. B. (2003). *Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA A receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from Drosophila melanogaster*. Br J Pharmacol 140:1363–1372.

- Qian H., Martin R. J. y Robertson A. P. (2006). *Pharmacology of N -, L -, and B -subtypes of nematode nAChR resolved at the single-channel level in Ascaris suum*. FASEB J 20:2606–2608.
- Rand J. B. (2007). *Acetylcholine*. In: *The C. elegans Research Community*, editors. WormBook. <http://www.wormbook.org>. pp. 1–21.
- 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 408:470–475.
- Rankin C. H. (2002). *From gene to identified neuron to behaviour in Caenorhabditis elegans*. Nat Rev Genet 3:622- 630.
- Rayes D., De Rosa M. J., Bartos M. y Bouzat C. (2004). *Molecular Basis of the Differential Sensitivity of Nematode and Mammalian Muscle to the Anthelmintic Agent Levamisole*. J Biol Chem 279:36372–36381.
- Rayes D., Flamini M., Hernando G. y Bouzat C. (2007). *Activation of Single Nicotinic Receptor Channels from Caenorhabditis elegans muscle*. Mol Pharmacol 71:1407–1415.
- Rayes D., Rosa D., Spitzmaul G. y Bouzat C. (2001). *The anthelmintic pyrantel acts as a low efficacious agonist and an open-channel blocker of mammalian acetylcholine receptors*. Neuropharmacology 41:238–245.
- Reiner G. N., Delgado-Marín L., Olguín N., Sánchez-Redondo S., Sánchez-Borzone M., Rodríguez-Farré E., Suñol C. y García D. A. (2013). *Gabaergic Pharmacological Activity of Propofol Related Compounds as Possible Enhancers of General Anesthetics and Interaction with Membranes*. Cell Biochem Biophys 67:515–525.
- Richmond J. E. y Jorgensen E. M. (1999). *One GABA and two acetylcholine receptors function at the C. elegans neuromuscular junction*. Nature Neurosci 2:791–798.
- Robertson A. P. y Martin R. J. (2007). *Ion-channels on parasite muscle: Pharmacology and physiology*. Invert Neurosci 7:209–217.
- Robertson A. P., Clark C. L., Burns T. A., Thompson D. P., Geary T. G., Trailovic S. M. y Martin R. J. (2002). *Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in Ascaris muscle*. J Pharmacol Exp Ther 302:853–860.
- Robertson A. P., Puttachary S., Buxton S. K. y Martin R. J. (2015). *Tribendimidine: Mode of Action and nAChR Subtype Selectivity in Ascaris and Oesophagostomum*. PLoS Neg Trop Dis 9:1–15.
- Robertson S. J. y Martin R. J. (1993). *Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasite Ascaris suum*. Br J Pharmacol 108:170-178.
- Roeber F., Jex A. R. y Gasser R. B. (2013). *Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective*. Parasit Vectors 6:1-13.
- Ruiz-Lancheros E., Viau C., Walter T. N., Francis A. y Geary T. G. (2011). *Activity of novel nicotinic anthelmintics in cut preparations of Caenorhabditis elegans*. Int J Parasitol 41:455–461.
- Ruppert E. E. y Barnes R. D. (1996). Zoología de los Invertebrados. 6ta edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A, México.

- Salamone F. N., Zhou M., y Auerbach A. (1999). *A Re-Examination of Adult Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor Channel Activation Kinetics*. *J Physiol* 516(Pt 2):315-330.
- Sali A., Potterton L., Yuan F., van Vlijmen H. y Karplus M. (1995). *Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER*. *Proteins* 23:318-326.
- Sangaletti R. y Bianchi L. (2013). *A method for culturing embryonic C. elegans cells*. *J Vis Exp* (79):e50649.
- Sangster N. C., Bannan S. C., Weiss A. S., Nulf S. C., Klein R. D. y Geary T. G. (1999). *Haemonchus contortus: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from P-glycoprotein*. *Exp. Parasitol* 91:250-257.
- Sawin E. R., Ranganathan R. y Horvitz H. R. (2000). *C. elegans locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway*. *Neuron* 26:619-631.
- Schuske K., Beg A. A. y Jorgensen E. M. (2004). *The GABA nervous system in C. elegans*. *Trends Neurosci* 27:407-414.
- Scoccia J., Castro M. J., Faraoni M. B., Bouzat C., Martín V. S. y Gerbino D. C. (2017). *Iron (II) promoted direct synthesis of dibenzo [b , e] oxepin-11 (6H) -one derivatives with biological activity . A short synthesis of doxepin*. *Tetrahedron* 73:2913-2922.
- Singh M. (1980). *Amylase release from dissociated mouse pancreatic acinar cells stimulated by glucagon: effect of membrane stabilizers*. *J. Physiol* 309:81 -91.
- Spurny R., Debaveye S., Farinha A., Veys K., Vos A. M., Gossas T., Atack J., Bertrand S., Bertrand D., Danielson U. H., Tresadern G. y Ulnes C. (2015). *Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E2543-2552.
- Stiernagle T. (2006). *Maintenance of C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community.
- Taly A., Delarue M., Grutter T., Nilges M., Le Novere N., Corringer P. J., Changeux J. P. (2005). *Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism*. *Biophys J* 88:3954-3965.
- Taylor M. A., Hunt K. R. y Goodyear K. L. (2002). *Anthelmintic resistance detection methods*. *Vet Parasitol* 103:183-194.
- Timmons L., Tabara H., Mello C. C. y Fire A. Z. (2003). *Inducible Systemic RNA Silencing in Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14: 2972-2983.
- Tong F. y Coats J. R. (2012). *Quantitative structure-activity relationships of monoterpenoid binding activities to the housefly GABA receptor*. *Pest Manag Sci* 68:1122-1129.
- Tong F., Gross A. D., Dolan M. C. y Coats J. R. (2013). *The phenolic monoterpenoid carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor*. *Pest Manag Sci* 69:775-780.

- Touroutine D., Fox R. M., Von Stetina S. E., Burdina A., Miller D. M. y Richmond J. E. (2005). *acr-16 encodes an essential subunit of the levamisole-resistant nicotinic receptor at the Caenorhabditis elegans neuromuscular junction*. J Biol Chem 280:27013–27021.
- Towers P. R., Edwards B., Richmond J. E. y Sattelle D. B. (2005). *The Caenorhabditis elegans lev-8 gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit*. J Neurochem 93:1-9.
- Trailović S. M., Ivanović S. R y Robertson A. P. (2015). *Muscle type of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) in mammals, and nematodes, the similarities and differences as a key for the selective toxicity of anthelmintic drugs*. Research Signpost 661:1–18.
- Trailović S. M., Marjanović D. S., Nedeljković Trailović J., Robertson A. P. y Martin R. J. (2015). *Interaction of carvacrol with the Ascaris suum nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action*. Parasitol Res 114:3059–3068.
- Trailović S. M., Robertson A. P., Clark C. L. y Martin R. J. (2002). *Levamisole receptor phosphorylation: effects of kinase antagonists on membrane potential responses in Ascaris suum suggest that CaM kinase and tyrosine kinase regulate sensitivity to levamisole*. J Exp Biol 205:3979–3988.
- Trojanowski N. F., Raizen D. M. y Fang-Yen, C. (2016). *Pharyngeal pumping in Caenorhabditis elegans depends on tonic and phasic signaling from the nervous system*. Sci Rep 6:22940.
- Unwin N. y Fujiyoshi Y. (2012). *Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing*. J Mol Biol 422:617–634.
- Vassilatis D. K., Arena J. P., Plasterk R. H., Wilkinson H. A., Schaeffer J. M., Cully D. F. y Van der Ploeg L. H. (1997). *Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in Caenorhabditis elegans. Isolation and characterization*. J Biol Chem 272:33167–33174.
- Verma S., Kashyap S. S., Robertson A. P. y Martin R. J. (2017). *Functional genomics in Brugia malayi reveal diverse muscle nAChRs and differences between cholinergic anthelmintics*. Proc Natl Acad Sci USA 114:5539–5544.
- Von Samson-Himmelstjerna G., Coles G. C., Jackson F., Bauer C., Borgsteede F., Cirak V. Y., Demeler J., Donnan A., Dorny P., Epe C., Harder A., Höglund J., Kaminsky R., Kerboeuf D., Küttler U., Papadopoulos E., Posedi J., Small J., Várady M., Vercruyse J. Y Wirtherle N. (2009). *Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes*. Parasitol Res 105:825–834.
- Wang H. L., Toghraee R., Papke D., Cheng X. L., McCammon J. A., Ravaioli U. y Sine S. M. (2009). *Single-channel current through nicotinic receptor produced by closure of binding site C-loop*. Biophys. J 96:3582-3590.
- Wick J. Y. (2012). *Aspirin: A history, a love story*. Consultant Pharmacist 27:322–329.
- Williamson E. M. (2001). *Synergy and other interactions inn phytomedicines*. Phytomedicine. 8:401-409.

- Williamson S. M., Robertson A. P., Brown L., Williams T., Woods D. J., Martin R. J., Sattelle D. B. y Wolstenholme A. J. (2009). *The nicotinic acetylcholine receptors of the parasitic nematode Ascaris suum: Formation of two distinct drug targets by varying the relative expression levels of two subunits*. PLoS Pathog 5:1–11.
- Wolstenholme A. J. (2012). *Glutamate-gated chloride channels*. J Biol Chem 287:40232–40238.
- Wolstenholme A. J., Fairweather I., Prichard R., Von Samson-Himmelstjerna G. y Sangster N. C. (2004). *Drug resistance in veterinary helminths*. Trends Parasitol 20:469–476.
- Xiu X., Puskar N. L., Shanata J. A., Lester H. A. y Dougherty D. A. (2009). *Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation- π interaction*. Nature 458:534–537.
- Xu H., Delling M., Jun J. C. y Clapham D. E. (2006). *Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels*. Nature Neurosci 9:628–635.
- Xu M., Molento M., Blackhall W., Ribeiro P., Beech R. y Prichard R. (1998). *Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog*. Mol Biochem Parasitol 91:327–335.
- Yeon J., Kim J., Kim D. Y., Kim H., Kim J., Du E. J., Kang K. J., Lim H. H., Moon D. y Kim K. (2018). *A sensory-motor neuron type mediates proprioceptive coordination of steering in C. elegans via two TRPC channels*. PLoS Biol 16:1–26.
- Young M. D., Jeffery G. M., Freed J. E. y Morehouse W. G. (1958). *Bephenium, a new drug active against human hookworm*. J Parasitol 44:611–612.
- Zhang J., Xue F., Liu Y., Yang H. y Wang X. (2013). *The structural mechanism of the Cys-loop receptor desensitization*. Mol Neurobiol 48:97–108.
- Zhang S. y Kuhn JR. (2013). *Cell isolation and culture*. WormBook, ed. *The C. elegans Research Community*.
- Zhang S., Banerjee D. y Kuhn J.R. (2011). *Isolation and Culture of Larval Cells from C. elegans*. PLoS ONE 6:e19505.

PUBLICACIONES

"Activation of *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive and mammalian nicotinic receptors by the antiparasitic bephenium". **Turani O.**, Hernando G., Corradi J. y Bouzat C. (2018). *Mol Pharmacol* 94:1270-1279. <https://doi.org/10.1124/mol.118.113357>.

"*Caenorhabditis elegans* muscle Cys-loop receptors as novel targets of terpenoids with potential anthelmintic activity". Hernando G., **Turani O.** y Bouzat C. (2019). *PLoS Negl Trop Dis* 13(11): e0007895. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007895>.

"A new antagonist of *Caenorhabditis elegans* glutamate-activated chloride channel with anthelmintic activity". Castro M. J.& **Turani O.**& Faraoni M. B., Gerbino D. y Bouzat C. (2020). *Front Neurosci* 14:879. doi: 10.3389/fnins.2020.00879.

(& Estos autores contribuyeron igualmente al trabajo).