

TÍTULO

PROPIEDADES FUNCIONALES Y FARMACOLÓGICAS DE RECEPTORES *Cys-loop* ANIÓNICOS DE *Caenorhabditis elegans*. BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS.

AUTORES

Noelia Rodríguez Araujo ¹; Guillermina Hernando ¹; Jeremías Corradi ¹; Cecilia Bouzat ¹

1-Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

RESUMEN

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

C. elegans es, además, un modelo de nematodo parasítico, dado que presenta características morfológicas y bioquímicas propias del filo *Nematoda*. Posee una organización del sistema nervioso semejante a la de especies parasíticas, y es sensible a la mayoría de las drogas utilizadas en quimioterapia antihelmíntica. Los receptores *Cys-loop* de nematodos tienen importancia clínica por ser blancos de fármacos antihelmínticos.

Los canales iónicos activados por ligandos son proteínas integrales de membrana que acoplan la unión de un neurotransmisor específico a la apertura de un canal iónico, lo que permite el pasaje de iones de un lado a otro de la membrana. Dentro de esta clase de receptores se incluye la superfamilia de receptores *Cys-loop* integrada por los receptores nicotínicos de acetilcolina (AChRs) y el receptor de 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃), los cuales en vertebrados son exclusivamente permeable a cationes (excitatorios), y por los receptores de ácido γ -aminobutírico tipos A (GABAA) y receptores de glicina, los cuales son permeables a aniones (inhibitorios).

Estudiamos el receptor MOD-1 de la familia de receptores *Cys-loop* presente en nematodos. Este receptor es activado por serotonina y es permeable a cloruro, a diferencia del receptor 5-HT₃ de mamífero, el cual es permeable a sodio. (Ranganathan et al., 2000). Es similar a los canales de GABA y de glicina de mamíferos en el sitio de unión de agonistas. Poco se sabe acerca de su función molecular en *C. elegans* y especies parasíticas. Por sus características especiales y su ausencia en humanos podría actuar como un nuevo blanco antihelmíntico.

Nos enfocamos en descifrar aspectos farmacológicos y de relación estructura-función de MOD-1, así como sus diferencias con otros receptores *Cys-loop* de mamíferos.

Desciframos las propiedades farmacológicas de MOD-1 y buscamos moduladores novedosos con potencial actividad antihelmíntica mediante la realización de registros de electrofisiología en células de mamíferos que expresan de forma heteróloga MOD-1 y ensayos de actividad locomotora en *C. elegans*.

La elucidación de la farmacología molecular de MOD-1 mejora nuestro conocimiento de la función y la selectividad farmacológica de los receptores *Cys-loop* y contribuye a determinar su potencial como un nuevo objetivo para la terapia antihelmíntica. **METODOLOGÍA:** -Subclonación de cDNA de MOD-1 en el vector pcDNA 3.1: Para la expresión transitoria de receptores, en primer lugar, los cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) del receptor MOD-1 fue subclonado en el vector pCDNA3.1. Se confirmó mediante secuenciación.

-Expresión heteróloga del receptor MOD-1: Para la expresión del receptor utilizamos un sistema de expresión heteróloga transitoria. El cDNA conteniendo MOD-1 se incorporó mediante la técnica de transfección por precipitación con fosfato de calcio. Para ello utilizamos cultivos

celulares BOSC23, derivadas de las células HEK 293, con un 40-50% de confluencia, se incorporaron una mezcla del cDNA de MOD-1 por placa de Petri de 35mm y un plásmido pRBG4-GFP que codifica una proteína verde fluorescente para permitir la identificación de las células transfectadas cuando son observadas con luz ultravioleta. Luego de 24-72 horas de incubación, se logra la expresión del receptor en la membrana celular y, se pueden realizar los estudios electrofisiológicos. (Bouzat et al., 2008)

Estudios Electrofisiológicos: Los registros de corrientes macroscópicas se realizan en la configuración *whole-cell* para lo que se utiliza un sistema de perfusión rápida que permite el cambio de solución en 0,1 ms. Las mediciones de pico de corriente en función de la concentración de la droga permiten realizar curvas dosis-respuesta y determinar el EC_{50} , y la medición de la constante de decaimiento permite estimar la velocidad de desensibilización. (Rodríguez Araujo et al., 2020)

La metodología y estrategias de manipulación de *C. elegans* se realizan de acuerdo con los protocolos disponibles en Wormbook. (Stiernagle 2006)

-Ensayos de motilidad de *C. elegans*: el testeado de drogas lo realizamos utilizando un lector automatizado de motilidad infrarroja, WMicrotracker. Se recolectaron nematodos sincronizados en estadio adultos jóvenes. Por pocillo se colocaron aproximadamente 50 nematodos. Se dejaron estabilizar 30 minutos y el movimiento basal se midió durante 30 minutos para normalizar la actividad de movimiento del 100% para cada pocillo al comienzo del ensayo. Luego, las drogas o el agua (en el caso de los controles), se agregaron a un volumen final de 100 ml por pocillo. Se cuantificó la motilidad en cada condición durante la incubación. **RESULTADOS:** CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL RECEPTOR MOD-1: Los registros electrofisiológicos en la configuración de célula completa mostraron que MOD-1 se desensibiliza lentamente y se recupera de la desensibilización con una constante de tiempo de aproximadamente 1 s.

En comparación con el receptor 5-HT_{3A} de vertebrados, las curvas de dosis-respuesta fueron similares para 5-HT pero muy diferentes para los agonistas ortostéricos triptamina y 2-Me-5HT. EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE DROGAS ANTIHELMÍNTICAS SOBRE EL RECEPTOR MOD-1: Los antihelmínticos ivermectina (IVM), levamisol y piperazina (PZE), que son agonistas de otros receptores *Cys-loop*, no activaron MOD-1. Sin embargo, IVM produjo una inhibición leve e irreversible y PZE produjo una inhibición profunda y reversible de las corrientes de MOD-1 provocadas por 5-HT. El análisis indicó que PZE es un antagonista no competitivo de MOD-1, revelando una función novedosa de este fármaco.

ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO EN *C. elegans*: 5-HT produce una parálisis rápida y reversible de gusanos de tipo salvaje (WT) mientras que los mutantes MOD-1 son parcialmente resistentes en condiciones similares, lo que indica que MOD-1 es el principal objetivo de 5-HT en este tipo de ensayos.

Los ensayos adicionales que utilizan combinaciones de fármacos en WT y cepas mutantes confirmaron la inhibición de la actividad de MOD-1 por IVM y PZE. **CONCLUSIONES:**

Identificamos corrientes macroscópicas activadas por serotonina y caracterizamos el receptor MOD-1 expresado en células BOSC23, para ser utilizado como un nuevo blanco de fármacos antiparasitarios, y revelar diferencias en la selectividad de fármacos entre receptores *Cys-loop* de vertebrados y MOD-1.

La inhibición de piperazina de las corrientes de 5-HT por preincubación y no co-aplicación con el agonista sugiere fuertemente que la piperazina es un antagonista no competitivo de MOD-1, revelando así un nuevo blanco farmacológico para este agente antiparasitario.

La caracterización de la activación de MOD-1 y la identificación de nuevos compuestos moduladores contribuyen a la comprensión de su papel en los gusanos, así como al desarrollo de nuevos fármacos antihelmínticos.

Los ensayos de comportamiento en *C. elegans* validaron los resultados obtenidos en los estudios electrofisiológicos, demostrando ser MOD-1 uno de los blancos terapéuticos de las drogas testeadas.

La elucidación de la farmacología molecular de MOD-1 mejora nuestro conocimiento de la función y la selectividad farmacológica de los receptores *Cys-loop* y contribuye a determinar su potencial como un nuevo objetivo para la terapia antihelmíntica. **REFERENCIAS:**

-Ranganathan, R., Cannon, S. C., & Horvitz, H. R. (2000). MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature*, 408(6811), 470..

-Bouzat C, Bartos M, Corradi J, and Sine SM (2008) The interface between extracellular and transmembrane domains of homomeric Cys-loop receptors governs openchannel lifetime and rate of desensitization. *J Neurosci* 28:7808–7819.

-Rodriguez Araujo, N., Fabiani, C., Mazarini Dimarco, A., Bouzat, C., & Corradi, J. (2020). Orthosteric and Allosteric Activation of Human 5-HT3A Receptors. *Biophysical journal*, 119(8), 1670–1682. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.08.029>

-Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi/10.1895/wormbook.1.101.1. <http://www.wormbook.org>.

Palabras clave: *Caenorhabditis elegans*. Receptores *Cys-loop*. Antihelmínticos. MOD-1.

Area temática: Farmacología, Farmacodinamia, Farmacocinética y Biofarmacia.

Nombres y Apellido del expositor: Noelia Marisol Rodriguez Araujo

Correo electrónico del expositor: noeliarodriguez@inibibb-conicet.gob.ar