



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

“EFECTO DE LA FLUOXETINA SOBRE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DEL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL DE MAMÍFEROS EXPRESADAS EN OVOCITOS DE *Xenopus*
laevis”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
Q.F.B. ANA LUISA MORALES TOXQUI

DIRECCIÓN DE TESIS
DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. ROCIO BRENDA ANGUIANO SERRANO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

QUERÉTARO, FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por: QFB Ana Luisa Morales Toxqui, cuyo título es: “Efecto de la Fluoxetina sobre Proteínas de Membrana de Sistema Nervioso Central de Mamíferos expresadas en Ovocitos de *Xenopus laevis*” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario (Tutor)

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Vocal:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Suplente:

Dra. Brenda Rocío Anguiano Serrano

Suplente:

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Maricela Luna Muñoz

Coordinadora del Programa Maestría en Ciencias (Neurobiología)

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo validar la expresión de proteínas de membrana provenientes del SNC en un sistema como el ovocito de *Xenopus laevis*, con la finalidad de desarrollar un método que permitirá encontrar las interacciones entre los ligandos y las moléculas blanco.

Se consideró que el antidepresivo fluoxetina era una droga adecuada para validar la metodología que proponemos, debido al impacto en el sector salud y a los antecedentes sobre la afinidad que tiene por otros receptores, distintos a su blanco, el transportador de serotonina.

Por este motivo evaluamos su efecto en los ovocitos de *Xenopus laevis* expresando RNAm del SNC para validar la expresión funcional de estas moléculas y su interacción con una droga.

En el presente trabajo mostramos que en una sola metodología, en la cual se tiene un ambiente homogéneo, se puede demostrar que una molécula conocida puede interactuar con proteínas de membrana del sistema nervioso central de mamíferos expresadas en el ovocito, siendo éste un modelo efectivo para la búsqueda de nuevos fármacos que ayuden al tratamiento de trastornos diversos como el de la depresión.

SUMMARY

This project aims to validate the NCS protein expression in the membrane of the *Xenopus laevis* oocyte to develop a methodology capable to detect the ligand – molecular targets interactions.

It was felt that the antidepressant fluoxetine was a drug to validate the methodology that we propose due to impact in the health sector, as well as evidence of its affinity for receptors other than its target, the serotonin transporter.

In the present work has been demonstrated that in one methodology, with an homogeneous environment, a characterized molecule can interact with membrane proteins of mammalian NCS expressed in the oocyte, which is an effective model for the development and research of new drugs that help to treat various disorders such as depression.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Becario No. 231394), por el apoyo económico que me otorgó durante la realización de mis estudios de Maestría.

A mi tutor, Dr. Rogelio Arellano Ostoá, por su disposición, paciencia y apoyo otorgado en la realización de este proyecto.

A mi co-tutora, Dra. Teresa Edith Garay Rojas, por ser mi guía en esta formación académica.

A los miembros del comité tutor, Dra. Brenda Anguiano Serrano y al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, por revisar y enriquecer mi trabajo cada semestre.

A los miembros del jurado, que tan amablemente revisaron la tesis y aportaron valiosas sugerencias y comentarios.

A Letty por recordarme que tengo que terminar mi tesis, mil gracias.

A mis padres por todo su amor, confianza y apoyo en mis momentos de catarsis.

A ti, que a tu lado he encontrado un mundo lleno de oportunidades, un logro más juntos y los que faltan por venir.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	La depresión	3
1.2	El sistema serotoninérgico	6
1.2.1	La serotonina	6
1.2.2	Localización en el sistema nervioso central	7
1.2.3	La síntesis y degradación de la serotonina	7
1.2.4	Los receptores serotonina	8
1.2.5	La función del sistema serotoninérgico	12
1.3	La fluoxetina	14
1.3.1	Mecanismo de acción y farmacocinética de la fluoxetina	14
1.3.2	Interacciones moleculares con fluoxetina	16
1.4	Modelo de estudio de proteínas de membrana en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	18
2	ANTECEDENTES	19
3	JUSTIFICACIÓN	21
4	HIPÓTESIS	22
5	OBJETIVO GENERAL	22
5.1	Objetivos particulares	22
6	MÉTODOS Y MATERIALES	23
6.1	Extracción de RNA total y purificación de RNAm de cerebro de rata	23
6.2	Obtención de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> para registro electrofisiológico	25
6.3	Registro electrofisiológico por control de voltaje	26
6.3.1	Evaluación de la expresión del RNAm de cerebro y efectos de fluoxetina	26
6.3.2	Evaluación del efecto de Fluoxetina sobre canales iónicos, receptores ionotrópicos y metabotrópicos en ovocitos con expresión de RNAm de cerebro de rata	28
7	RESULTADOS	29

7.1	Extracción de RNA total de cerebro de rata	29
7.2	Purificación de RNAm de cerebro de rata	30
7.3	Expresión funcional de RNAm en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	30
7.4	Efecto de la fluoxetina sobre proteínas de membrana del sistema nervioso expresadas en ovocitos de <i>Xenopus</i> .	34
8	DISCUSIÓN	44
9	CONCLUSIONES	48
10	PERSPECTIVAS	48
11	REFERENCIAS	49
	INDICE DE FIGURAS	53
	INDICE DE TABLAS	55

“EFECTO DE LA FLUOXETINA SOBRE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMÍFEROS EXPRESADAS EN OVOCITOS DE *Xenopus laevis*”

1 INTRODUCCIÓN

Una de las limitantes en la industria farmacéutica, para el desarrollo de nuevos fármacos, es la falta de modelos biológicos que permitan evaluar cuantitativa y cualitativamente la interacción de las drogas con los blancos moleculares.

En el presente trabajo se plantea el estudio de una metodología, el método BILBOX (acrónimo correspondiente a Búsqueda de Interacciones Ligando-Receptor en Ovocitos de *Xenopus*), con la cual se puedan detectar los diferentes blancos moleculares de una molécula altamente estudiada, la fluoxetina, en un modelo de expresión heteróloga de proteínas de membrana del sistema nervioso central.

Para la validación de esta metodología se optó por emplear como sonda una droga utilizada en el tratamiento de la depresión, una enfermedad con un alto impacto dentro de la salud pública en México (Medina-Mora et al., 2003).

1.1 La depresión

La depresión es un trastorno afectivo caracterizado por la alteración del estado de ánimo del paciente, que puede estar reducido (ánimo depresivo) o elevado. Aproximadamente 121 millones de personas sufren de depresión alrededor del mundo con una prevalencia estimada del 15% en mujeres y 8% en varones (World Health Organization, 2003). La depresión mayor (depresión endógena) es una enfermedad que afecta en México, según la Secretaría de Salud, a 8 millones de personas de las cuales sólo una de cada 40 recibe tratamiento psiquiátrico. Estudios epidemiológicos recientes indican que la edad media en la que comienzan los síntomas de este trastorno se sitúa en los 20 años, siendo éste un gran cambio con respecto a generaciones pasadas en

las cuales la depresión se encontraba vinculada con personas entre 40 a 50 años de edad.

Aproximadamente 70% de todos los suicidios son atribuidos a la depresión sin tratamiento y se ha determinado que 15% de los pacientes deprimidos terminan en suicidio consumado. La OMS ha declarado a la depresión mayor como la causa más importante de morbilidad en la mujer.

También la OMS ha determinado que el cuadro de mortalidad y de enfermedad sufrirá un cambio radical en las próximas 2 décadas, en la cual, la depresión mayor ocupará el segundo lugar después de las enfermedades coronarias. Asimismo, para el año 2020 será la principal causa de discapacidad, mientras que al presente es la cuarta enfermedad discapacitante a nivel mundial (WHO, 2003). Por lo tanto, la depresión mayor es una enfermedad con un substancial impacto sobre el desarrollo y la funcionalidad de las personas y en consecuencia en la sociedad, impacto superior al de enfermedades como la hipertensión y la diabetes, constituyendo un problema serio de salud pública.

La depresión se caracteriza esencialmente por incapacidad de experimentar placer (anhedonia). De acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) existen diferentes criterios para diagnosticar la depresión, enumerados en la Tabla 1. Al menos 5 o más síntomas deben de estar presentes durante un periodo de 2 semanas para considerar que una persona padece de depresión mayor.

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de la depresión mayor de acuerdo al DSM-IV.

1. Estado deprimido la mayor parte del día (sentimiento de tristeza o vacío).
2. Disminución marcada del interés o placer, en todas o la mayoría de las actividades cotidianas.
3. Pérdida de apetito o de peso.
4. Insomnio o hipersomnia.

5. Agitación o retardo psicomotor.
6. Fatiga o pérdida de energía.
7. Sentimiento de excesiva culpa o inutilidad.
8. Dificultad para concentrarse o dificultad para tomar decisiones.
9. Pensamientos recurrentes de muerte, ideación suicida con o sin un plan específico.

La hipótesis sobre la etiología de la depresión

Evidencias en pacientes con depresión y sin tratamiento han demostrado disminución de la actividad serotoninérgica (Ellis y Salmond, 1994). Asimismo, en estudios post-mortem se ha encontrado una disminución en la concentración cerebral de serotonina en pacientes con depresión (Stockmeier et al., 1998); estos resultados indican la participación de serotonina en el trastorno de la depresión.

La hipótesis catecolaminérgica fue la primera que se postuló como etiología de la depresión; en ella se atribuían las causas del trastorno a un descenso en los niveles de noradrenalina en el sistema nervioso central.

Durante la década de los años 60, investigadores descubrieron que el antidepresivo tricíclico imipramina bloqueaba la recaptura de serotonina (5-HT) y de noradrenalina (NA); apoyando la noción de que la depresión está asociada a una disminución de estas aminas (hipótesis monoaminérgica).

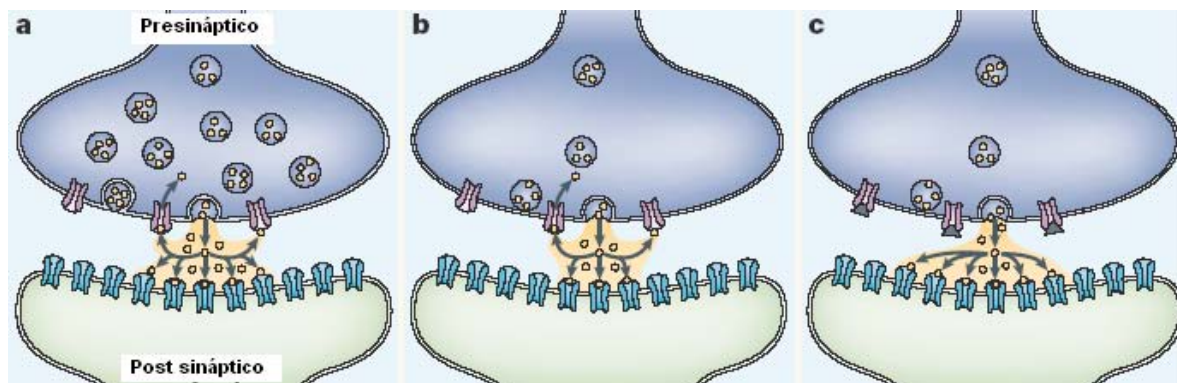


Fig. 1. Hipótesis monoaminérgica. a) En la transmisión normal, los neurotransmisores monoaminérgicos son liberados y se unen a los receptores en la terminal postsináptica. La transmisión es finalizada por la recaptura del neurotransmisor. b) En la depresión, la disminución de la concentración de monoaminas en el espacio sináptico produce un desorden afectivo. c) El bloqueo de los sitios de recaptura incrementa la concentración de neurotransmisores monoaminérgicos y su acción sobre los receptores postsinápticos restaurando el trastorno afectivo.

Los mecanismos de acción de los tratamientos farmacológicos, no son del todo comprendidos; sin embargo, la mayoría de los antidepresivos tienen como factor común el hecho de que afectan selectivamente dos o más pasos en la síntesis, el empaquetamiento o la degradación de los neurotransmisores monoaminérgicos 5-HT, DA y NA (Siegel et al., 2006), por lo que han proporcionado información para comenzar a elucidar el rol de los neurotransmisores monoaminérgicos en la patofisiología de la depresión.

1.2 El sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico es uno de los sistemas más relacionados con la etiología de la depresión por lo que en las secciones siguientes se presenta información importante en ese contexto.

1.2.1 La serotonina

A principios de los años 50s se identificaron propiedades funcionales similares entre la serotonina y el LSD (droga alucinógena) y en los años 60s se identificó por medio de estudios inmunocitoquímicos la distribución de neuronas serotoninérgicas en el cerebro (Dahlstrom y Fuxe, 1964).

La serotonina pertenece a la clase de aminas biogénicas (indolaminas o monoaminas) y su biosíntesis se encuentra vinculada con la de las catecolaminas.

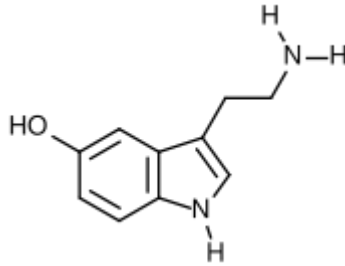


Fig. 2. Estructura de Serotonina (5-HT). Fórmula química de 5-Hidroxitriptamina.

1.2.2 Localización en el sistema nervioso central

En el sistema nerviosa central, las neuronas de los núcleos del rafé son la fuente principal de síntesis y liberación de la 5-HT en el cerebro; el núcleo del rafé es un conjunto de neuronas localizadas a lo largo de toda la longitud del tronco encefálico, centrado alrededor de la formación reticular. Las proyecciones serotoninérgicas inervan la corteza cerebral, hipocampo, amígdala, ganglios basales, núcleo geniculado lateral, núcleo supraquiasmático, tectum óptico, sustancia gelatinosa y médula espinal. Así, la activación de este sistema serotoninérgico tiene efectos en varias áreas del cerebro, lo que explica su importancia en una gran variedad de fenómenos fisiológicos y procesos patológicos (Dahlstrom y Fuxe, 1954).

1.2.3 La síntesis y la degradación de la serotonina (5-HT)

La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido L-triptofano, el cual es introducido en la célula y convertido en 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por la enzima triptofano-5-hidroxilasa; la enzima aminoácido alfa-aromático descarboxilasa (DAC), convierte el 5-HTP en 5-hidroxitriptamina (5-HT). Después de que la 5-HT es liberada en el espacio sináptico ésta es recapturada por el transportador de serotonina. Una vez introducida al interior de la célula, la 5-HT es degradada por la enzima monoamina oxidasa obteniéndose 5-hidroxiindolacetaldehído (Watling, 2001) (Fig. 3).

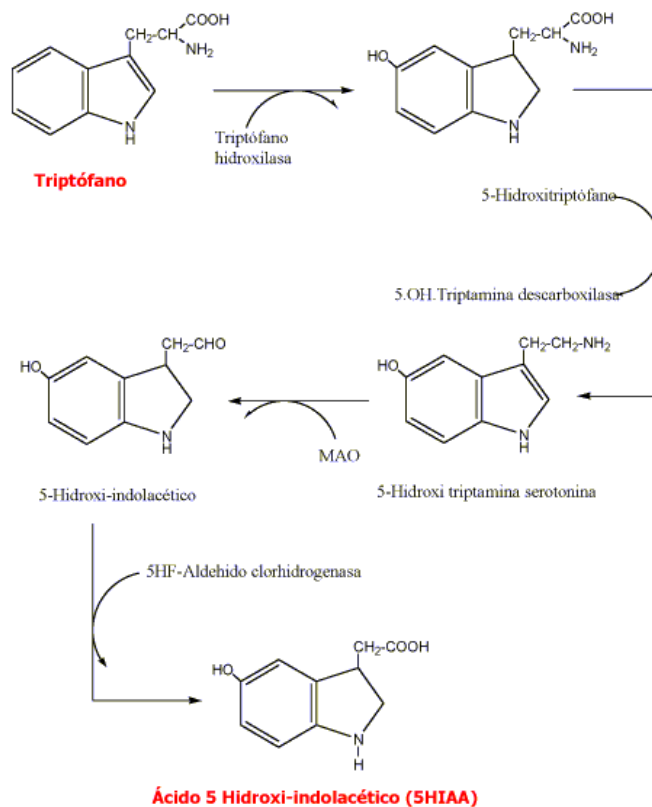


Fig. 3. Síntesis y degradación de serotonina. La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido L-triptofano y degradada a 5-hidroxiindolacetaldehído (Watling, 2001).

1.2.4 Los receptores a 5-HT

La idea de que diferentes tipos de receptores a 5-HT existen en el sistema nervioso central fue desarrollada en la segunda mitad del siglo pasado. Actualmente, se conocen una gran diversidad de receptores serotoninérgicos entre los que se encuentran receptores acoplados a proteínas G y un receptor-canal.

Tabla 2. Tipos de receptores 5-HT y su relación con estructuras moleculares.

Tipos de receptor 5-HT	
Receptores acoplados a proteínas G	
Familia de receptores 5-HT ₁	5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{1F}
Familia de receptores 5-HT ₂	5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C}

Familia de receptores 5-HT ₄	5-HT _{4S} , 5-HT _{4L}
Familia de receptores 5-HT ₅	5-HT _{5A} , 5-HT _{5B}
Familia de receptores 5-HT ₆	
Familia de receptores 5-HT ₇	
Canal iónico	5-HT ₃

Los receptores de serotonina pertenecen a 7 tipos denominados 5-HT₁ a 5-HT₇, y de acuerdo a sus propiedades estructurales y farmacológicas se han clasificado en subtipos. También se han identificado variantes del receptor de serotonina, 5-HT₄, generadas por splicing alternativo (Gerald et al., 1995).

Aún cuando la estructura primaria del receptor determina su identidad, cambios sustanciales en la secuencia de aminoácidos puede no afectar su función (ejemplo 5-HT_{1Dα} y 5-HT_{1Dβ}), mientras que en otros casos una pequeña alteración puede modificarla de manera importante (ejemplo 5-HT_{1B} y 5-HT_{1Dβ}) (Hartig et al., 1992).

El tipo 5-HT₁ se compone de 5 subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F} que han sido denominados de “inhibición lenta”; todos ellos actúan a través de proteínas G_i que disminuyen la actividad de adenilato ciclasa y están presentes tanto de manera presináptica como en la postsinapsis.

El tipo de receptor 5-HT₂ se compone de 3 subtipos los 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}, éstos son denominados de “excitación lenta”, ya que actúan a través de proteínas G_q activando la fosfolipasa C e incrementando los niveles de Ca⁺⁺ intracelular. El tipo 5-HT₄ se compone de 2 subtipos los 5-HT_{4s} y 5-HT_{4L}, que junto con los tipos 5-HT₅ y 5-HT₆ actúan también a través de proteínas G_i incrementando la síntesis de AMPc. El tipo 5-HT₃ se denomina de “excitación rápida” y representa el único receptor de la familia que forma un receptor-canal permeable selectivo a cationes.

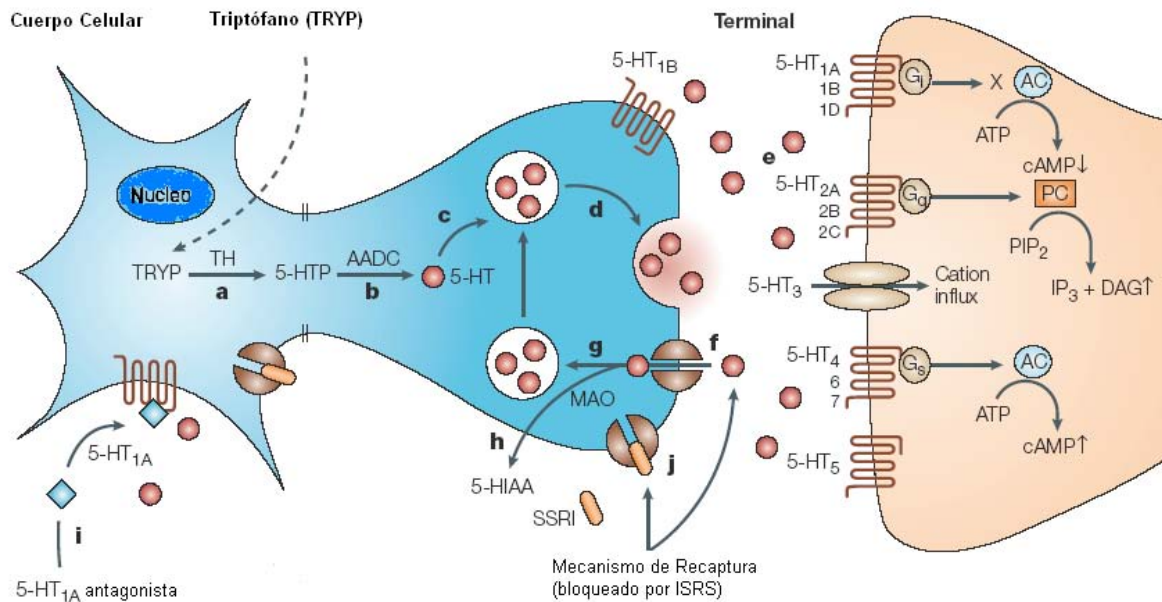


Fig. 4. Procesos asociados a la transmisión serotoninérgica. A) La Triptofano-5-hidroxilasa (TH) cataliza la conversión de triptofano (TRYP) a 5-hidroxitriptofano (5-HTP). **B)** La Enzima aminoácido alpha-aromático descarboxilasa (AADC) cataliza la conversión de 5-htp a 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) y **c)** es almacenada en vesículas de almacenamiento y luego **D)** es liberada al espacio sináptico, donde **E)** puede activar receptores de la familia 5-HT (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7), los cuales presentan su respectivo sistema de transducción en la neurona post-sináptica. **F)** La 5-HT es recapturada por el transportador de 5-HT presente en la terminal presináptica. **G, H)** En la terminal presináptica, la 5-HT puede ser almacenada en vesículas o degradada por la monoamino oxidasa (MAO). **I)** La 5-HT activa el receptor presináptico 5-HT_{1A}, el cual puede ser bloqueado con antagonistas selectivos. **J)** Inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS) incluyendo fluoxetina, inhibe la acción del transportador de serotonina. 5-HIAA, Ácido 5-hidroxiindolacético; AC, adenilato ciclasa; DAG, diacilglicerol; IP₃, inositol-1,4,5-trisfosfato; PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (Wong et al., 2005).

El Transportador de 5-HT

El transportador de 5-HT es el principal mecanismo de terminación de la acción del neurotransmisor en el espacio sináptico, teniendo un papel importante en mantener su homeostasis. Este transportador pertenece a la familia de transportadores de membrana dependientes de Na^+/Cl^- . Por cada ciclo de transporte, un ion de Na^+ y un ion de Cl^- y una molécula de 5-HT son co-transportados, lo cual produce que el transporte sea de naturaleza electrogénica, produciendo una corriente de entrada.

La estructura del transportador de 5-HT está conformada por 12 segmentos transmembranales, con las regiones amino y carboxilo terminales dirigidas al interior de la célula, y un dominio extracelular entre los segmentos 3 y 4 que parece contribuir al plegamiento y estabilidad de la proteína (Andersen et al., 2009).

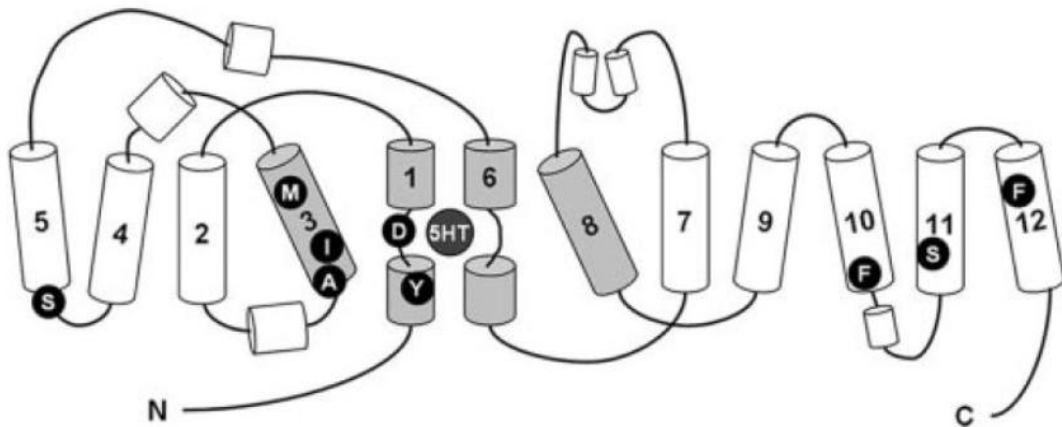


Fig. 5. Topología del transportador de 5-HT. El sitio de unión a 5-HT está formado por residuos posicionados en TM1, TM3, TM6 y TM8 (mostrados en gris). Los residuos implicados en el reconocimiento de los fármacos Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) y los antidepresivos tricíclicos están indicados en círculos negros: Y, Tyr-95; D, Asp-98; A, Ala-169; I, Ile-172; M, Met-180; S, Ser-276; F, Phe-513; S, Ser-545; y F, Phe-586 (Andersen et al., 2009).

1.2.5 La función del sistema serotoninérgico

La 5-HT ejerce diversos efectos fisiológicos en el sistema gastrointestinal, las células sanguíneas y el sistema nervioso central.

En el sistema nervioso central, se sabe que la 5-HT juega un papel importante como neurotransmisor en diversas funciones, como por ejemplo, en la inhibición de la ira, la conducta de agresión, la regulación de la temperatura corporal, el sueño, el vómito, la sexualidad y la regulación del apetito.

Además de esto, la 5-HT es también un mediador periférico de diversas señales. Por ejemplo, se encuentra en altas concentraciones en el tracto gastrointestinal y, en las plaquetas en circulación, investigaciones recientes sugieren que la 5-HT juega un papel importante en la regeneración hepática y actúa como mitógeno. También modula el funcionamiento vascular así como, la frecuencia del latido cardiaco, y regula la secreción de hormonas por parte de la hipófisis.

La función serotoninérgica es fundamentalmente inhibitoria. Ejerce influencia sobre el sueño y se relaciona también con los estados de ánimo, las emociones y los estados depresivos. Cambios en el nivel de esta sustancia se asocian con desequilibrios mentales como la esquizofrenia. También juega un papel importante en el trastorno obsesivo compulsivo y el desorden de ansiedad.

En el control del apetito se ha demostrado que los antidepresivos inhibidores de la recaptura de serotonina, como la fluoxetina, reducen el apetito y la cantidad de comida que normalmente se ingiere, sugiriendo que el incremento de la transmisión serotoninérgica disminuye la ingesta por medio del incremento de la saciedad (McGuirk et al., 1992)

En la tabla 3 se señalan algunas de las respuestas provocadas en el sistema nervioso central (CNS) por la estimulación de receptores serotoninérgicos.

Tabla 3. Acción serotoninérgica.

Receptor	Acción
5-HT_{1A}	CNS: inhibición neuronal, efecto sobre sueño, ingesta, termoregulación y ansiedad.
5-HT_{1B}	CNS: inhibición presináptica, efecto sobre sueño, ingesta, termoregulación, ansiedad y vasoconstricción pulmonar.
5-HT_{1D}	CNS: locomoción, vasoconstricción cerebral.
5-HT_{2A}	CNS: excitación neuronal, efecto sobre sueño, ingesta, termoregulación y ansiedad; contracción, vasoconstricción del músculo liso; agregación plaquetaria.
5-HT_{2B}	Contracción musculatura del estómago.
5-HT_{2C}	CNS, Secreción líquido cerebroespinal (plexo coroide).
5-HT₃	CNS: excitación neuronal, ansiedad.
5-HT₄	CNS: excitación neuronal; motilidad gastrointestinal.
5-HT₅	CNS: desconocido.
5-HT₆	CNS: desconocido.
5-HT₇	CNS, desconocido.

Como se mencionó previamente, uno de los desórdenes neurológicos del sistema serotoninérgico es el trastorno de la depresión. Para el tratamiento de este trastorno se han utilizado los siguientes antidepresivos (Ban TA, 2006), los cuales se encuentran clasificados de acuerdo a su estructura química o sitio de acción:

- Antidepresivos tricíclicos
- Heterocíclicos, fármacos de segunda y tercera generación
- Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS)
- Inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO).

1.3 La fluoxetina

La fluoxetina (3-(p-trifluorometilfenoxi)-N-metil-3-fenilpropilamina, Fig. 6) fue introducida en el mercado con el nombre de Prozac y su prescripción incrementó hasta finales de la década pasada, debido a que fue sustituido por la sertralina y la paroxetina (Stafford et al., 2001). Sin embargo, la fluoxetina es un antidepresivo de gran efectividad, ampliamente estudiado y caracterizado farmacológicamente, lo cual la hace una droga de gran interés en la búsqueda de nuevos fármacos útiles en diferentes padecimientos, así como una herramienta en la investigación básica referente a la etiología de diferentes enfermedades. En este sentido, la fluoxetina está indicada para el tratamiento del trastorno obsesivo-compulsivo, la bulimia nerviosa, el trastorno disfórico premenstrual y el trastorno de pánico, aun cuando es prescrita con mayor frecuencia para el trastorno de la depresión (Wong et al., 2005).

La síntesis de la fluoxetina es considerada como un hito en la psicofarmacología moderna, puesto que se trató de la primera molécula antidepresiva con un perfil de seguridad favorable y efectos colaterales bien tolerados, lo que permitió que alcanzara gran difusión. La acción serotoninérgica de la fluoxetina es más selectiva y no se vincula con reacciones adversas de tipo sedante y cardiovascular, típicamente observadas en los agentes antidepresivos conocidos hasta entonces, especialmente los tricíclicos. Las reacciones adversas más frecuentes son boca seca, pérdida de peso, ansiedad, nerviosismo e insomnio; asimismo, en ciertas dosis reducen la ingesta de alimentos (Goudie et al., 1976), y la agresividad (Mandrioli R et al., 2012).

1.3.1 Mecanismo de acción y farmacocinética de la fluoxetina

El primer reporte en describir y dar una breve caracterización de la fluoxetina como un inhibidor de recaptura de serotonina fue desarrollado por Wong y colaboradores en 1974. Estudios *in vivo* han demostrado la alta afinidad de la fluoxetina como un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (Fuller et al., 1974). La selectividad de fluoxetina como inhibidor de la recaptura de 5-HT en comparación con la recaptura de

noradrenalina es alta ya que se requiere una concentración para inhibir el 50% (IC_{50}) de la recaptura de serotonina de 70 nM comparado con 10 μ M requerido para inhibir en la misma proporción a la de noradrenalina (Wong et al., 1975).

La fluoxetina es usualmente administrada una vez al día como cápsulas; la dosis típica es 20 mg para el tratamiento de la depresión (Wood et al., 1993) y es absorbida en una alta proporción después de su administración, siendo su volumen de distribución el más alto entre los ISRS disponibles.

La biodisponibilidad oral es aproximadamente 90%, debido a su primera fase de metabolismo en el hígado por enzimas citocromo P450, teniendo una vida media de 1 a 3 días (Sweetman, 2004).

Los metabolitos producto del metabolismo de la fluoxetina son norfluoxetina (desmetilación) y p-trifluorometilfenol (oxidación o-dealquilación) (Fig. 6). El principal metabolito es norfluoxetina, el cual tiene una actividad farmacológica comparable a fluoxetina (Altamira et al., 1994) y una vida media más larga de 4 a 16 días (Hiemke y Hartter, 2000).

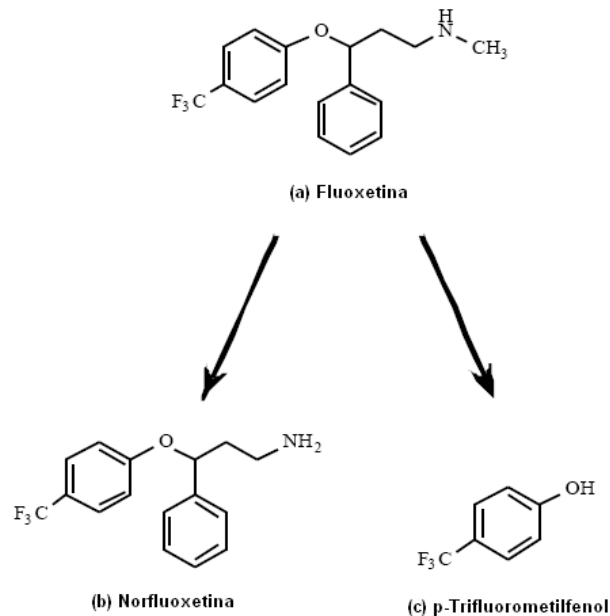


Fig. 6. Estructura química de Fluoxetina (a) y sus metabolitos Norfluoxetina (b) y p-Trifluorometilfenol (c). Fluoxetina y su metabolito norfluoxetina son inhibidores de recaptura de serotonina (Gram L, 1994).

1.3.2 Interacciones moleculares con fluoxetina

Parte del desarrollo de los fármacos específicos reside en el estudio del mecanismo de acción y su especificidad a diferentes receptores. Por ejemplo, aún cuando la fluoxetina se ha indicado como un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina se han realizado estudios de afinidad, funcionales y electrofisiológicos en los cuales se ha demostrado que la fluoxetina posee una diversidad de sitios de unión y efectos moleculares en células neurales, cardíacas, de músculo liso y epiteliales.

Con respecto al sistema serotoninérgico, se ha demostrado en estudios de sitios de unión que la fluoxetina tiene una baja afinidad por los receptores 5-HT_{1(A, B, C y D)}, 5-HT_{2(A y C)} y 5-HT₃ (Wong et al., 2005) afinidad por los receptores 5-HT_{1B/D} (Werling et al., 2007); en estudios funcionales se ha demostrado, por la técnica de control de voltaje que inhibe la corriente mediada por el receptor 5-HT₃ en neuronas del ganglio nodoso de rata y que bloquea aproximadamente 50% de la corriente generada por 5-HT en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan heterológicamente el receptor de rata 5-HT_{2c} (Ni y Miledi, 1997).

El sistema colinérgico presenta una interacción con el sistema serotoninérgico, la atropina, un antagonista muscarínico bloquea receptores de serotonina (Gerschenfeld y Stefani, 1966). Por este motivo se han realizado estudios para poder evaluar la interacción que tiene la fluoxetina con receptores colinérgicos. El sistema colinérgico funciona a través de la acción de 2 tipos de receptores: nicotínicos y muscarínicos. Los receptores nicotínicos tienen una respuesta excitatoria y pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos; los receptores muscarínicos son de respuesta excitatoria o inhibitoria y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G.

Se ha demostrado usando la técnica de control de voltaje con dos electrodos, que la fluoxetina bloquea los receptores nicotínicos conformados por las subunidades $\alpha 2\beta 4$ o $\alpha 3\beta 4$ expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* (García-Colunga et al., 1997).

Debido a la actividad anticonvulsionante de la fluoxetina, se han realizado estudios para identificar la interacción con receptores a GABA. En 1999, se realizaron estudios de sitios de unión demostrando que la fluoxetina interacciona con el receptor GABA_A (Tunnickliff et al., 1999). Posteriormente se realizaron estudios funcionales con la técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula completa en la línea celular HEK-293T transfectadas con las secuencias codificantes del receptor GABA_A demostrando que la fluoxetina incrementa la respuesta de manera dosis dependiente y, la sensibilidad de la respuesta se encuentra relacionada con el tipo de subunidad del receptor GABA expresado (Robinson et al., 2003; Derry et al., 2007). Sin embargo, en estudios de sitios de unión no se encontró afinidad de fluoxetina con el receptor GABA_A en un cultivo neuronal de corteza (Werling et al., 2007)

En el sistema glutamatérgico se han caracterizado los receptores ionotrópicos AMPA, kainato y NMDA y metabotrópicos clase I, clase II y clase III. Se ha reportado que el sistema glutamatérgico se encuentra involucrado en el trastorno de la depresión (Zarate et al., 2002) y la fluoxetina inhibe las corrientes iónicas generadas por la activación de estos receptores. Estos resultados fueron obtenidos empleando la técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula completa (Szasz et al., 2007). En receptores a glicina se ha demostrado que inhibe la corriente inducida por glicina en cultivos neuronales de hipocampo de rata con una IC₅₀ de 30 μ M (Ye et al., 2008). En estudios de afinidad se ha demostrado inhibición de 60% de afinidad en receptores muscarínicos y 98% de afinidad para glicina (Werling et al., 2007)

Con respecto a los receptores kaínicos, se tienen estudios moleculares en los cuales se demostró que la fluoxetina incrementa los niveles de transcripción de receptores AMPA/kainato en corteza frontal (Barbon et al., 2006), no se tiene un reporte funcional del efecto de la fluoxetina en estos receptores.

Además, estudios indican que la fluoxetina tiene efectos adicionales en diversos canales iónicos. Se ha reportado que inhibe el canal Ca^{++} tipo T (Cav3.1 y Cav3.2) en la línea celular tsA201 (Traboulsie et al., 2006), inhibe canales de Ca^{++} voltaje dependientes en neuronas de hipocampo (Deák et al., 2000), bloquea canales de K^+ (Kv1.1) expresados heterológicamente en ovocitos de *Xenopus laevis* (Tygat et al., 1997) y bloquea canales aniónicos en células endoteliales de arteria pulmonar (Maertens et al., 1999)

1.4 Modelo de estudio de proteínas de membrana en ovocitos de *Xenopus laevis*

En 1971 se demostró que el RNAm de mamíferos inyectado en ovocitos de *Xenopus laevis* es incorporado en la maquinaria de traducción y las proteínas codificadas por estos mensajeros son sintetizadas en el citoplasma del ovocito (Gurdon et al., 1971). Más tarde, a principios de los años 80s el grupo de trabajo de Ricardo Miledi demostró la expresión heteróloga de receptores, canales iónicos y otras proteínas del sistema nervioso de mamíferos en la membrana del ovocito a través de la inyección del ARNm (Miledi et al., 1982).

Los ovocitos se diferencian en seis etapas (etapa I a VI). Debido a que alcanzan diámetros de 1.2 a 1.4 mm, los ovocitos en las dos últimas etapas (V y VI) son utilizados para los registros electrofisiológicos y expresión de proteína de membrana gracias a su fácil manipulación y a que pueden sobrevivir *in vitro* durante varios días, además de ser fáciles de inyectar y de contener una eficiente maquinaria de síntesis de proteínas.

La expresión de proteínas funcionales en la membrana del ovocito ha permitido el estudio de canales iónicos y receptores por medio de estudios electrofisiológicos empleando el método llamado control de voltaje con dos electrodos.

Sin embargo, una desventaja es que debido a su gran tamaño se tiene una capacitancia de membrana extremadamente grande (aprox. 150-200 nF), lo que causa un lento tiempo de ajuste de mantenimiento de voltaje. Esto hace difícil obtener cualquier dato durante los primeros 1-2 ms de una despolarización, el tiempo durante el cual rápidamente se activan los canales sensibles a voltaje tales como el canal de Na^+ . La capacitancia del ovocito no es un problema cuando se examinan respuestas lentas o respuestas dependientes de ligando en la ausencia de cambios de voltaje, y han sido desarrolladas otras metodologías que permiten controlar el voltaje en regiones pequeñas de membrana en el ovocito como el llamado “macropatch” o el “cut-oocyte”, técnicas que restringen el área bajo control.

El sistema de expresión en ovocitos es empleado también para el análisis de la cascada de señalización de los receptores acoplados a proteínas G. Diversos tipos de receptores acoplados a proteínas G tales como los receptores 5HT_{1c} y receptores de glutamato, activan la cascada de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol vía la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) por proteínas G_q . El IP_3 se une a su receptor en reservorios intracelulares de Ca^{++} e induce el incremento de Ca^{++} citoplasmático. Una propiedad del ovocito de *Xenopus* es que la célula posee canales de Cl^- dependientes de Ca^{++} en su membrana plasmática por lo que la síntesis de IP_3 y su aumento origina una corriente de Cl^- en los ovocitos.

2 ANTECEDENTES

Las drogas han sido históricamente una herramienta básica para el estudio de la fisiología y el entendimiento de los fenómenos patológicos, y algunos de estos fármacos han sido utilizados como medicinas para disminuir o eliminar los síntomas presentados en alguna enfermedad.

Originalmente se propuso que la fluoxetina ejercía sus efectos terapéuticos mediante el incremento de la transmisión serotoninérgica, prácticamente de manera exclusiva a

través de la inhibición del transporte de serotonina y con un mínimo o ningún efecto sobre otros sistemas de neurotransmisores (Wong et al., 1974).

En estudios recientes señalan que la fluoxetina, a diferencia de otros ISRS, también aumenta los niveles de dopamina y noradrenalina en la corteza prefrontal; el mecanismo por el cual los niveles de estos neurotransmisores incrementa aún es desconocido (Koch et al., 2002); esto parece ir en contra de la especificidad sobre el sistema serotoninérgico reportada anteriormente por Wong y colaboradores.

Asimismo, se ha reportado que la fluoxetina presenta cierta afinidad por receptores a diferentes transmisores y no únicamente sobre el sistema serotoninérgico. En la Tabla 4 se enlistan los sitios de unión de la fluoxetina identificados por Werling y colaboradores (2007) al usar preparaciones de membrana provenientes de diferentes áreas cerebrales y donde se puede observar que puede desplazar a otras drogas específicas para los receptores α_2 noradrenérgicos, 5-HT_{1B/D}, muscarínicos, y de glicina y también al transportador de serotonina, pero no compite con drogas que se unen a receptores α_1 y β noradrenérgico, 5HT₂ y GABA_A.

Tabla 4. Sitios de unión de fluoxetina detectados por ensayo de competencia con agonistas o antagonistas específicos al receptor indicado.

Receptor	Área del cerebro para la preparación de membranas	Unión por competencia de agonistas / antagonistas
σ_2	Cerebelo	60% a 1 μ M
Histamina	Corteza	NC
Transportador de Serotonina	Hipocampo	100% a 1 μ M
α_1 noradrenérgico	Hipocampo	NC
α_2 noradrenérgico	Hipocampo	97% a 1 μ M
β noradrenérgico	Corteza	NC

Receptor	Área del cerebro para la preparación de membranas	Unión por competencia de agonistas / antagonistas
5-HT _{1B/1D}	Corteza	46% a 1 μ M
5-HT ₂	Hipocampo	NC
Muscarínico	Corteza frontal	60% a 1 μ M
Glicina	Cerebro completo	98% a 1 μ M
Transportador de Noradrenalina	Corteza	31% a 1 μ M
GABA _A	Corteza	NC

NC = No competencia

Sin embargo, otros estudios muestran discrepancias con estos resultados. Por ejemplo, se ha demostrado que la fluoxetina interactúa efectivamente con receptores GABA_A, expresados en células de mamífero, originando la potenciación de la respuesta (Robinson et al., 2003) y esto parece explicar las propiedades anticonvulsiantes de la fluoxetina reportadas con anterioridad (Dailey et al., 1992).

Otros estudios funcionales indican que la fluoxetina actúa como un agonista de los receptores 5-HT_{2C} en cultivos primarios de astrocitos (Chen et al., 1995) y en ovocitos de *Xenopus* que expresan estos receptores de manera heteróloga (Ni y Miledi, 1997). También, se ha demostrado que la fluoxetina inhibe las corrientes de membrana producidas por la activación de receptores nicotínicos de acetilcolina expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* (García-Colunga et al., 1997) o de canales de Cl⁻ (Maertens et al., 1999) y de potasio dependientes de voltaje del tipo Kv1.1 expresados en el ovocito de *Xenopus laevis* (Tytgat et al., 1997). Del mismo modo, la fluoxetina bloquea canales de Ca⁺⁺ dependientes de voltaje en diferentes preparaciones celulares (Park et al., 1999; Deák et al., 2000; Traboulsie et al., 2006)

3 JUSTIFICACIÓN

Con base en esta información es evidente que las metodologías y modelos que han sido utilizados para detectar los blancos moleculares de la fluoxetina han sido variados; sin embargo, la información obtenida evidencia algunas inconsistencias, probablemente debidas a la misma diversidad de técnicas utilizadas. Dada la importancia que la información sobre las interacciones de la fluoxetina con diferentes proteínas de membrana podría representar para el completo entendimiento de los mecanismos de acción de esta droga, así como en el reconocimiento de los procesos funcionales involucrados en la depresión, en este trabajo proponemos desarrollar un método que permita evaluar de manera sistemática la interacción de la fluoxetina con una amplia gama de proteínas de membrana expresadas en el ovocito de *Xenopus laevis*. El método a desarrollar permitirá también realizar un análisis funcional de la interacción droga-proteína, analizando el efecto de la fluoxetina sobre las mismas empleando técnicas electrofisiológicas.

4 HIPÓTESIS

La fluoxetina interactúa y modula la actividad de diferentes proteínas de membrana del sistema nervioso expresadas en el ovocito de *Xenopus laevis*.

5 OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto de fluoxetina en ovocitos de *Xenopus laevis* expresando RNAm del sistema nervioso central.

5.1 Objetivos particulares

- Purificar el RNAm del cerebro de rata y expresarlo en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- Analizar el efecto de fluoxetina sobre receptores ionotrópicos y metabotrópicos en ovocitos expresando el RNAm de cerebro de rata.
- Analizar el efecto de fluoxetina sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en ovocitos expresando el RNAm de cerebro de rata.

6 MÉTODOS Y MATERIALES

6.1 Extracción de RNA total y purificación de RNAm de cerebro de rata

Para la extracción de RNA total, se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar, con un peso entre 250 a 300 g, proporcionados por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla, Querétaro. Se realizó decapitación y extracción del cerebro completo fue efectuada mediante la apertura del cráneo con material quirúrgico.

La extracción de RNA total de cerebro de rata fue realizada utilizando el método de Chomczynski y Sacchi, 1987 (Fig. 7). Para ello, el cerebro completo fue colocado en un tubo estéril de propilpropileno de 50 ml, adicionando 10 ml de solución desnaturizante (Solución D compuesta por tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio pH 7 25 mM, sarcosil 0.5%, β -mercaptoetanol 100 mM) y homogeneizado (homogeneizador Utraturax T25) durante 1-2 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se adicionó 1 ml de acetato de sodio (2 M, pH 4), 10 ml de fenol saturado con agua y 2 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1); entre cada adición se agitó hasta incorporación total y en la última adición se mantuvo el tubo 15 min en hielo. La mezcla se centrifugó durante 10 min a 9,500 rpm a una temperatura de 4°C (Centrifuga Beckman Allegra 21R, rotor C0650). Después, la fase acuosa se transfirió a un tubo estéril de polipropileno de 50 ml, y el RNA se precipitó con 1 volumen de isopropanol durante al menos una hora a -20°C.

El RNA fue empastillado por centrifugación durante 30 min a 9,500 rpm a 4°C. La pastilla fue resuspendida en 10 ml de solución D y nuevamente precipitada con 10 ml de isopropanol por al menos una hora a -20°C.

El RNA fue empastillado nuevamente bajo las condiciones previamente descritas y la pastilla lavada con etanol al 80%. Finalmente, el RNA fue resuspendido en 1 ml de agua estéril.

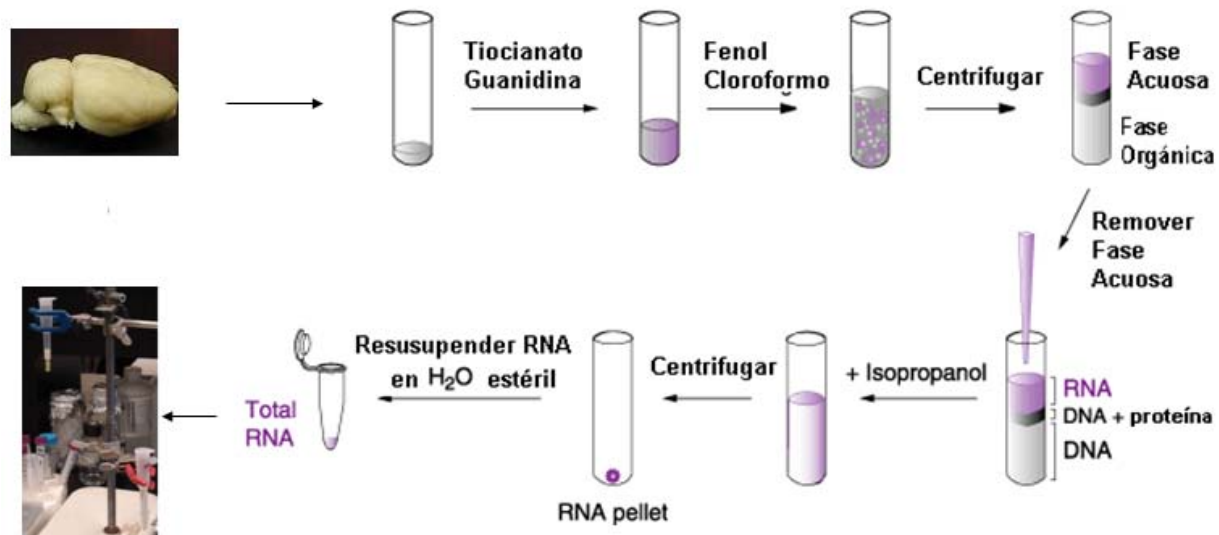


Fig. 7. Extracción de RNA total por el método de Chomczynski & Sacchi (1987).

El RNA total fue cuantificado por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en el espectrofotómetro Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000; también se determinó la absorbancia a 280 nm ya que la relación de las absorbancias a 260 y 280 permite evaluar la pureza del RNA; una relación menor de 1.8 es un indicativo de que existe algún contaminante en la muestra.

El RNA total fue analizado cualitativamente mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de agarosa, formaldehído (solución al 40%) y amortiguador MOPS 10X (Agua destilada, MOPS, acetato de sodio, 1 M, EDTA 0.5 M pH 7,0).

La purificación de RNAm fue realizada por medio de cromatografía en columna de oligo (dT)-celulosa. La columna fue tratada sucesivamente con 4 ml de 0.1 M NaOH, 6 ml de solución E (10 mM Tris HCl pH 7.6) o hasta alcanzar un pH de 6 – 7 en el líquido eluyente, y posteriormente con 3 ml de solución 1X (10 mM Tris HCl pH 7.6 y 0.5 M NaCl).

Una vez que la columna fue equilibrada, se aplicó el RNA total previamente ajustado a 10 mM Tris HCl pH 7.6 y 0.5 M NaCl con el amortiguador 2X y desnaturizado a 65°C. El RNA se aplicó 3 veces y después la columna fue lavada con 4 ml de solución 1X

recuperando alícuotas de 1 ml cada una; y finalmente se eluyó con 2.5 ml de solución E recuperada en alícuotas de 500 μ l cada una.

El RNAm fue precipitado con 1 volumen de etanol al 100% y 0.1 volumen de 3 M acetato de sodio ó 5 M acetato de amonio a -20°C durante toda la noche. Después, el RNAm fue empastillado por centrifugación durante 30 min a 14,000 rpm a 4°C (Beckman Coulter Microfuge 22R). La pastilla fue obtenida mediante decantación de la solución, lavada con etanol al 80% y centrifugada bajo las mismas condiciones (30 min / 14,000 rpm / 4°C). La pastilla de RNAm fue resuspendida en 50 μ l de agua estéril.

6.2 Obtención de ovocitos de *Xenopus laevis* para registro electrofisiológico

Los ovocitos fueron obtenidos de ranas *Xenopus laevis* (Xenopus I Ann Arbor, MI). Para ello, la rana fue anestesiada por hipotermia, colocándola en hielo por un mínimo de 30 min o hasta observar ausencia de reflejos. Una vez anestesiada, fue colocada en una cama de hielo, y en la zona baja del abdomen se llevó a cabo una incisión para obtener de dos a tres lóbulos ováricos; éstos fueron colocados en una caja de Petri con solución de Barth normal (BN, conteniendo: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO_3 , 0.33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.41 CaCl_2 , 0.82 MgSO_4 , 5 mM Hepes, 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina y un pH de 7.4); la rana fue suturada y colocada en agua a temperatura ambiente para su recuperación.

Los ovocitos en estadio V - VI fueron separados del lóbulo ovárico y tratados durante 30 - 45 min con colagenasa (tipo I de Sigma) a una concentración de 0.5 mg/ml en solución Ringer normal (RN, conteniendo: 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 5 M Hepes ajustada a pH 7 con NaOH 5N). Después del tratamiento enzimático los ovocitos fueron lavados 5 veces con solución Ringer e incubados durante toda la noche en solución Barth normal; al siguiente día la capa folicular remanente fue removida con la ayuda de pinzas finas de disección e incubados a 21°C en solución Barth por un mínimo de 12 horas. Se seleccionaron los ovocitos que estuvieran en condiciones óptimas y fueron microinyectados con 50 ng/50nl de RNAm ó 50 nl de agua estéril

como control; para microinyectar se utilizó una micropipeta de vidrio estéril (Dummond Scientific #3-000-210-G8) adaptada a una microjeringa (Microdispenser de 10 μ l Dummond). Posteriormente, los ovocitos fueron incubados nuevamente en solución Barth durante 5 días para la expresión del RNAm, al quinto o sexto día posterior a la microinyección, se realizó el estudio electrofisiológico y de unión a proteínas de membrana.

6.3 Registro electrofisiológico por control de voltaje

6.3.1 Evaluación de la expresión del RNAm de cerebro y efectos de fluoxetina

Los registros electrofisiológicos de ovocitos fueron realizados por la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Miledi, 1982). Con esta técnica se controla a un valor predeterminado el voltaje de la célula bajo estudio, de tal forma que se pueda medir la corriente transmembranal que fluye a este potencial; la corriente que fluye a través de la membrana es proporcional a su conductancia y ésta se encuentra determinada por la apertura y cierre de los canales iónicos (Hille, 2001).

El sistema es un circuito cerrado constituido por 2 electrodos intracelulares, uno de los cuales registra el voltaje (V') y otro inyecta corriente (I') a la célula. La señal se compara con un voltaje comando o de mantenimiento (V) que es el valor de voltaje al que se desea controlar la membrana; la diferencia entre ellos es compensada por una inyección de corriente, a través del electrodo I' cuya magnitud es determinada a través de un circuito de retroalimentación negativo (FBA). En el baño se encuentra un tercer electrodo que mide a través de un amperímetro la corriente (I) que cruza la membrana de la célula (Hille, 2001).

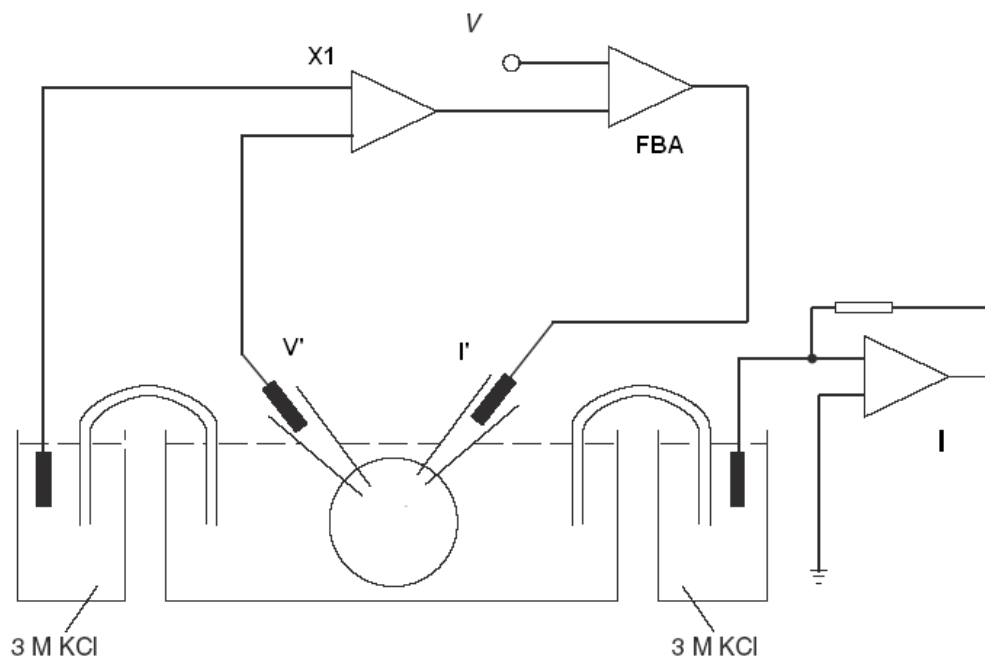


Fig. 8. Esquema de la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos. V' : es el electrodo de voltaje. $X1$: amplificador de voltaje. V : es el voltaje de mantenimiento. FBA : amplificador de retroalimentación negativa. I' es el electrodo intracelular de corriente, I es el amperímetro que se encuentra en el baño y detecta la corriente transmembranal (Modificada de Hille, 2001)

Los electrodos intracelulares V' e I' utilizados fueron elaborados con capilares de vidrio de borosilicato con un diámetro interno y externo de 1.2 y 2 mm respectivamente (WPI, FI, EUA). Los electrodos fueron llenados con solución de 3 M KCl y tuvieron una resistencia de 1-2 M Ω . El amplificador de control de voltaje empleado fue el GeneClamp 500B (Axon Inst., CA, EUA). La señal de corriente transmembranal fue registrada utilizando un osciloscopio marca Gould (D50-602), y almacenada digitalmente utilizando el convertidor A/D Digidata 1200A y el programa pClamp 9 (Axon Inst.).

El registro electrofisiológico de los ovocitos fue realizado dentro de un periodo de 5 – 6 días después de la inyección del RNAm. Regularmente, los ovocitos fueron controlados a un voltaje de -60 mV, la corriente transmembranal fue monitoreada mientras diferentes agonistas (serotonina (5HT), ácido glutámico (Glut), GABA y acetilcolina

(ACh)) fueron aplicados por separado adicionándolos al RN en una concentración de 100 μ M. Cada uno de los agonistas fue administrado durante 1 min, seguido de lavado con RN por 90 s o hasta la recuperación de la corriente basal. Las respuestas expresadas fueron comparadas con las obtenidas de los ovocitos control microinyectados con 50 nl de agua estéril.

6.3.2 Evaluación del efecto de Fluoxetina sobre canales iónicos, y receptores ionotrópicos y metabotrópicos en ovocitos con expresión de RNAm de cerebro de rata

Una vez comprobada la expresión de proteínas del sistema nervioso en ovocitos inyectados con el RNAm, se evaluó el efecto de la fluoxetina sobre las mismas.

La evaluación del efecto se realizó en el quinto o sexto día de expresión del RNAm; los ovocitos fueron colocados en la cámara de registro con perfusión continua de solución RN (10 ml/min) (Arellano et al., 1998).

Para evaluar el efecto de fluoxetina sobre los receptores membranales, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, fue realizado el siguiente protocolo: en un potencial de -60 mV, fue registrada la corriente transmembranal durante la aplicación de alguno de los diferentes agonistas probados (10 μ M de serotonina, ácido glutámico, GABA y acetilcolina y 50 μ M de ácido kaínico), los cuales fueron aplicados en solución RN por un periodo de tiempo de 20 s y realizando un lavado del agonista por un mínimo de 90 s. Posteriormente, se aplicó la fluoxetina (50 μ M) durante 20 s, continuando con una coaplicación por 20 s de fluoxetina junto con el agonista respectivo en la misma concentración, después de un lavado por un mínimo de 90 s.

Las respuestas obtenidas fueron analizadas usando los programas Clampfit (pClamp 8 suite; Axon Instruments) y Prism (GraphPad Software Inc.).

7 RESULTADOS

7.1 Extracción de RNA total de Cerebro de Rata

El RNA total fue obtenido de 25 ratas según el método descrito; cada uno de los cerebros utilizados representa una preparación independiente. La concentración del RNA total extraído en cada preparación fue cuantificada por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm. Los cálculos fueron realizados tomando en cuenta que 1 valor de Densidad Óptica a 260 nm corresponde a 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de RNA.

$$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1} = \text{DO}_{260} \times 40 \mu\text{g ml}^{-1} \times \text{volumen de dilución}$$

La concentración promedio obtenida del RNA total de las preparaciones utilizadas en el presente trabajo, fue de $2.371 \pm 0.88 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ con una relación 260:280 de 1.918 ± 0.057 indicativo de una muestra de RNA puro.

Con la finalidad de analizar cualitativamente el RNA total, fueron realizadas electroforesis en geles de agarosa al 1.4% en condiciones desnaturalizantes. Como se ilustra en la Fig. 9, se observan dos bandas bien definidas las cuales corresponden al RNA ribosomal 28S (banda superior) y 18S (banda inferior); asimismo, se observó la presencia de RNA de transferencia en la parte inferior. La proporción de las bandas de RNA 28S con respecto al 18S es de 2 a 1, indicativo de un RNA de buena calidad.

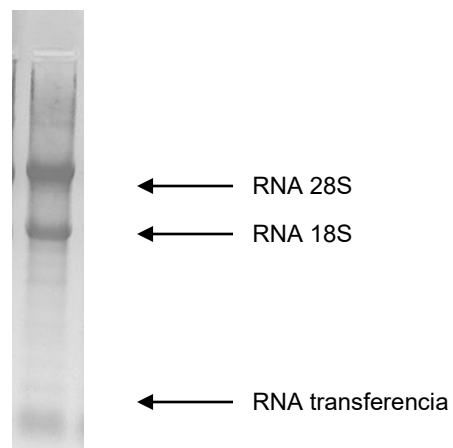


Fig. 9. Electroforesis del RNA total purificado del cerebro de rata. El gel fue teñido con bromuro de etidio, cargando una cantidad de $1\mu\text{g}$ de RNA total.

7.2 Purificación de RNAm de cerebro de rata

Una vez que se observó que la preparación de RNA total estaba en condiciones adecuadas, se purificó el RNAm mediante cromatografía en columna de oligo (dT)-celulosa. La cantidad de RNAm obtenida fue determinada mediante espectrofotometría, obteniendo concentraciones promedio de 90 μg con una relación 260:280 de 2.28 ± 0.14 de un total de 25 preparaciones. El RNAm obtenido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.4% y tal y como se observa en la figura 10; la cromatografía permitió eliminar una parte importante de los RNA ribosomales y de transferencia. En el carril 5 se puede apreciar cómo la región donde migran los mensajeros está enriquecida.

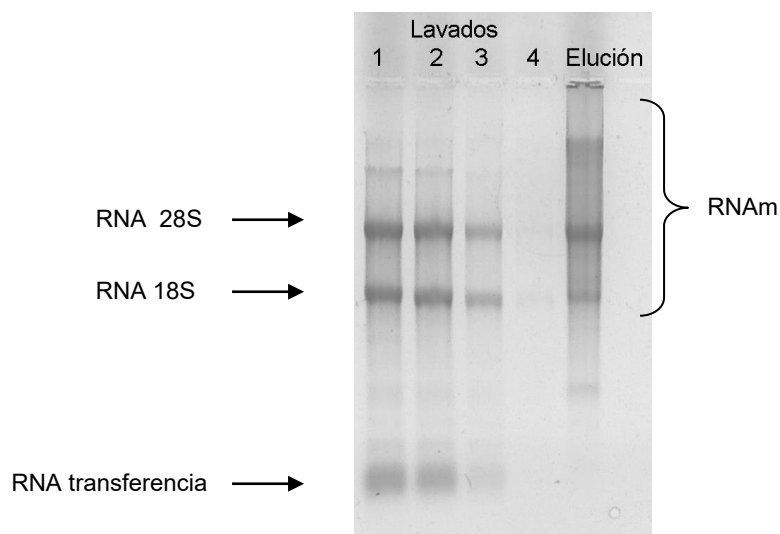


Fig. 10. Fotografía de gel de agarosa a una concentración de 1.4%. En esta fotografía se muestra el RNA obtenido en 4 lavados realizados a la columna antes de eluir el RNAm (carriles 1-4). En el carril 5 se muestra el RNAm purificado.

7.3 Expresión funcional de RNAm en ovocitos de *Xenopus laevis*

Con la finalidad de evaluar la expresión funcional de RNAm fue registrada la corriente transmembranal generada en los ovocitos mantenidos en un potencial de -60 mV ; se

registraron ovocitos inyectados con diferentes RNAm extraídos y solo se utilizó el RNAm cuya alta calidad de expresión de proteínas de membrana fue la requerida para realizar los estudios funcionales.

Los ovocitos (n=21, 4 donadores) estudiados presentaron un potencial de membrana en reposo de -60.3 ± 13.3 mV. Los ovocitos control inyectados con 50 nl de agua estéril no respondieron a la aplicación de ACh, 5HT, Glut o GABA (Fig. 11-12); indicando que no existe expresión endógena de receptores a los transmisores probados.

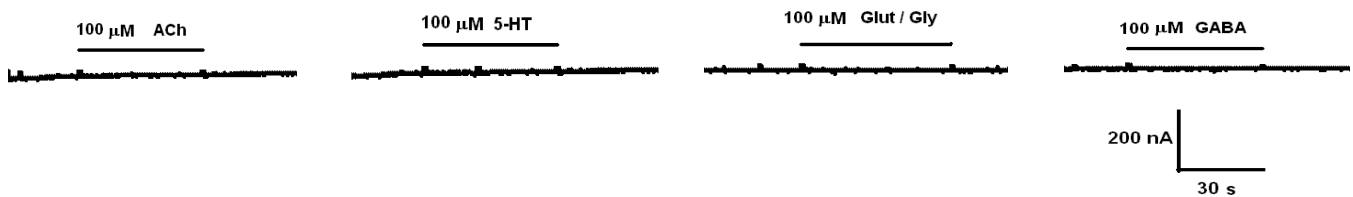


Fig. 11. Registro electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con 50 nl de agua estéril. En ovocitos control las aplicaciones de ACh, 5-HT, glutámico o GABA no provocaron respuestas eléctricas.

En cambio, los ovocitos inyectados con RNAm de cerebro respondieron con la perfusión de los mismos neurotransmisores, generaron corrientes robustas (Fig. 12). Se obtuvieron corrientes promedio para 5-HT de 1.34 ± 0.28 μA, para Glut 3.75 ± 1.76 μA y 632 ± 181.2 nA correspondientes a un 1º y 2º pico generados durante su aplicación, y para GABA de 672 ± 254.8 nA, así como para ACh de 452 ± 129.5 nA (Fig. 12-15). El RNAm obtenido de cerebro tuvo entonces una buena expresión funcional de diversas proteínas de membrana en ovocitos; entre estas proteínas se encuentran ejemplos de los principales grupos de receptores membranales. Así 5HT y ACh generaron corrientes membranales en el ovocito con características que corresponden a la activación de receptores metabotrópicos, generando corrientes iónicas entrantes con una cinética oscilatoria. Estas corrientes tienen las características típicas de corrientes acarreadas por iones Cl⁻ activadas a través de la síntesis de IP₃ y la liberación intracelular de Ca⁺⁺ (Miledi, 1982). En cambio, los neurotransmisores

GABA y Glut evocan corrientes entrantes con una cinética no oscilatoria, cuyas características corresponden con las esperadas para la activación de receptores-canal correspondientes, aniónicos en el caso de la perfusión de GABA (Parker et al., 1985) y catiónicos en el caso de los glutamatérgicos (Hirono et al., 1988). En este último caso se observaron algunas variaciones, probablemente debido a la existencia de una diversidad tanto de receptores-canal, como de receptores metabotrópicos, que en algunas ocasiones también pueden ser observados en nuestras preparaciones.

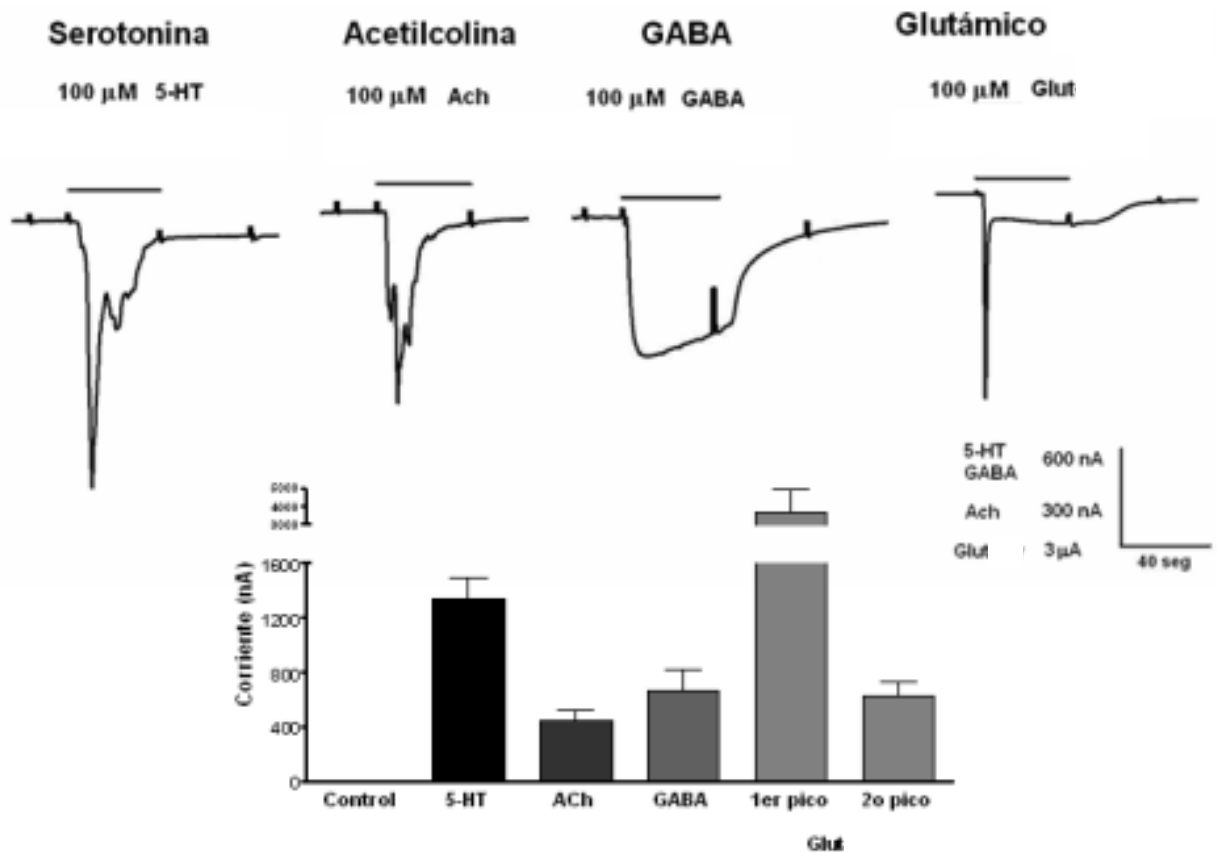
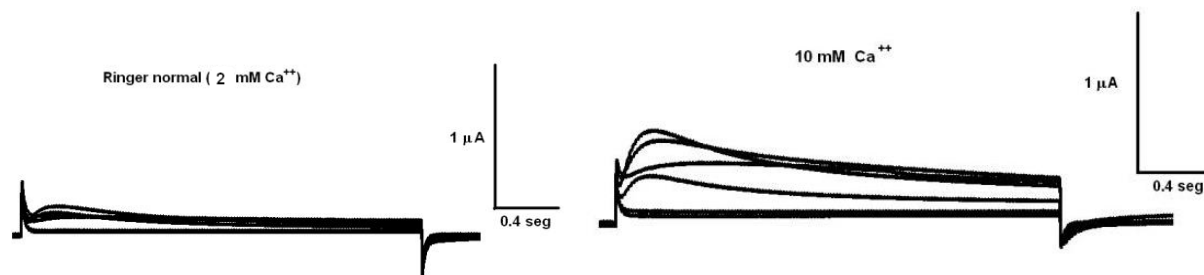


Fig. 12. Respuestas eléctricas generadas por neurotransmisores en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Los trazos muestran registros típicos de corrientes generadas en ovocitos inyectados con RNAm del cerebro por la estimulación de receptores metabotrópicos ante la aplicación de 5-HT o ACh, así como por receptores ionotrópicos estimulados por GABA o Glut.

Corriente T_{out}

La expresión de canales de Ca^{++} dependientes de voltaje fue explorada a través de la aplicación de pulsos despolarizantes desde un potencial controlado en -100 mV. Este protocolo de estimulación eléctrica provocó típicas corrientes de salida de característica transiente que de forma previa ha sido denominada corriente T_{out} (Miledi, 1982). Ha sido demostrado que la corriente T_{out} es debida a la activación de canales de Ca^{++} que dependen del voltaje y la apertura de estos canales permite el influjo de este catión al interior del ovocito; a su vez, el aumento de Ca^{++} intracelular activa los canales de Cl^- dependientes de Ca^{++} expresados de forma endógena en el ovocito generando una corriente saliente de Cl^- . En este estudio, en los ovocitos control la expresión de T_{out} resultó marginal (250 ± 31 nA); en cambio en ovocitos inyectados con el RNAm las respuestas a la despolarización generaron corrientes de 3.6 ± 0.5 μ A, mostrando que el RNAm promovió la expresión de canales de Ca^{++} y/o canales de Cl^- dependientes de Ca^{++} . Las corrientes T_{out} aumentan 8.83 ± 2.75 μ A cuando la despolarización de la membrana se efectuó en solución Ringer conteniendo 10 mM de Ca^{++} ($n=4$, 2 donadores), y fueron eliminadas en soluciones Ringer sin Ca^{++} ; estos experimentos mostraron claramente el requerimiento del influjo de Ca^{++} para la activación de la corriente.

OVOCITOS CONTROL



OVOCITOS INYECTADOS CON RNAm

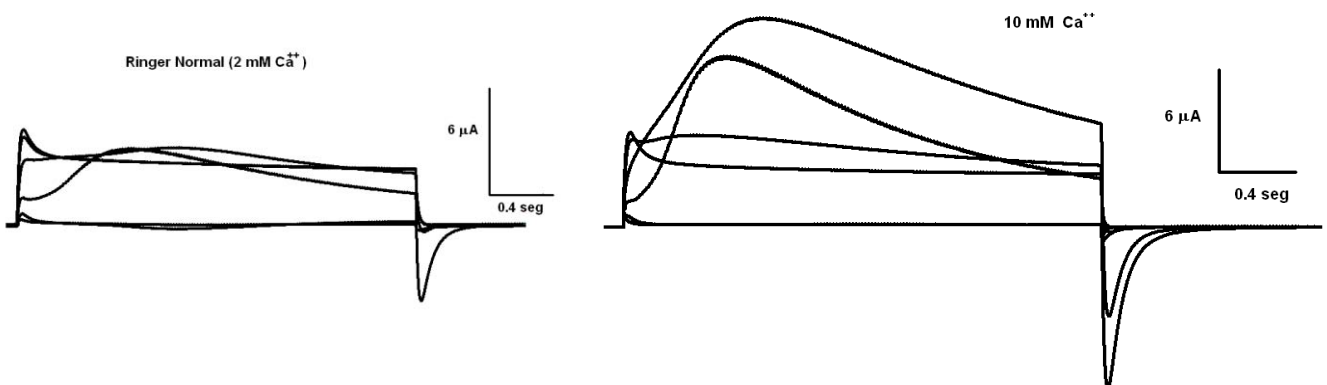
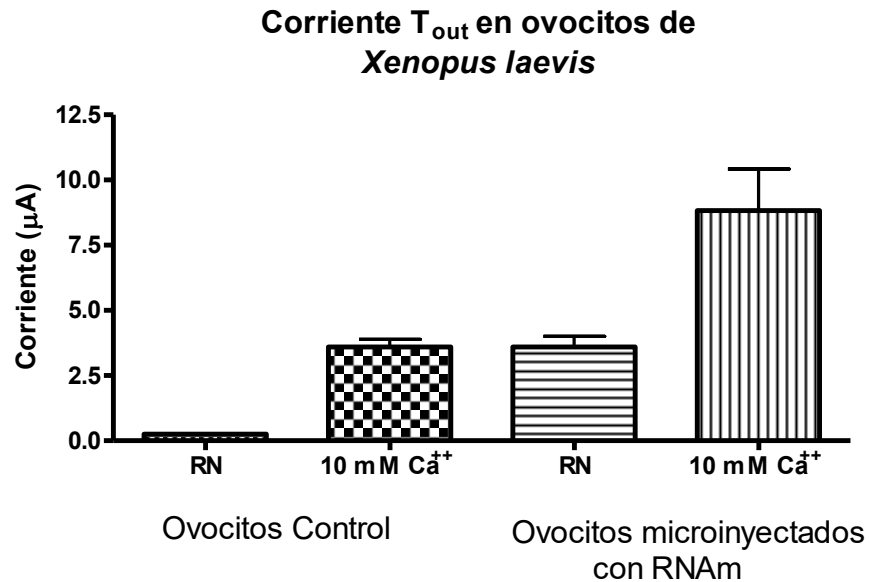


Fig. 13. Respuestas T_{out} en ovocitos control y ovocitos inyectados con RNAm.

Corriente T_{out} generada por despolarización de la membrana desde un potencial de mantenimiento de -100 mV; los trazos superimpuestos ilustran la corriente generada por pulsos despolarizantes aplicados secuencialmente en pasos de $+20$ mV, comenzando en -40 mV hasta $+60$ mV. Se muestran tanto las corrientes control como



las generadas en ovocitos inyectados, ambas en RN o Ringer conteniendo 10 mM Ca^{++} .

Fig. 14. Corriente T_{out} en ovocitos de *Xenopus laevis*. Amplitud de corriente generada por la perfusión de Ringer normal (Ca^{++} 2 mM) y alto Ca^{++} (concentración 10 mM) en ovocitos control o inyectados con RNAm de cerebro.

7.4 Efecto de la fluoxetina sobre proteínas de membrana del sistema nervioso expresadas en ovocitos de *Xenopus*.

Los resultados obtenidos y descritos en las secciones anteriores muestran que el ovocito inyectado expresó una colección amplia de las proteínas de membrana de interés; estas proteínas pueden ser estudiadas funcionalmente registrando sus características por medio de la electrofisiología, por lo que se obtiene una preparación en la cual pueden ser estudiados los efectos de fluoxetina sobre esta amplia gama de

proteínas en condiciones homogéneas y controladas. Los resultados son descritos en las secciones siguientes.

Efecto de fluoxetina sobre la corriente provocada por 5HT.

Con la aplicación de 5-HT sobre ovocitos desfoliculados de *Xenopus laevis* no se generó una corriente, indicando que el ovocito no tuvo receptores de 5-HT nativos. En ovocitos inyectados con el RNAm de cerebro fue observada ante la aplicación de 5-HT 10 μ M, una corriente entrante con un promedio de $1.07 \pm 0.73 \mu$ A. La aplicación de sólo fluoxetina 50 μ M no indujo una corriente u ocasionalmente generó una corriente entrante de amplitud pequeña que fue de 15 ± 12 nA. Cuando la fluoxetina 50 μ M fue aplicada junto con 5-HT 10 μ M en la solución de Ringer, la respuesta a 5-HT fue disminuida obteniendo valores en promedio de 95 ± 37.6 nA correspondiente a una inhibición de $91.12 \pm 5.36\%$ con respecto a la corriente inicial en la que fue aplicada únicamente 5-HT 10 μ M.

Después de un lavado con la solución fue observada la activación de la corriente a 5-HT 10 μ M con un promedio de 444 ± 281 nA; sin embargo, la recuperación no fue total siendo de $58.5 \pm 15.23\%$ con respecto a la corriente inicial previa a la perfusión con fluoxetina.

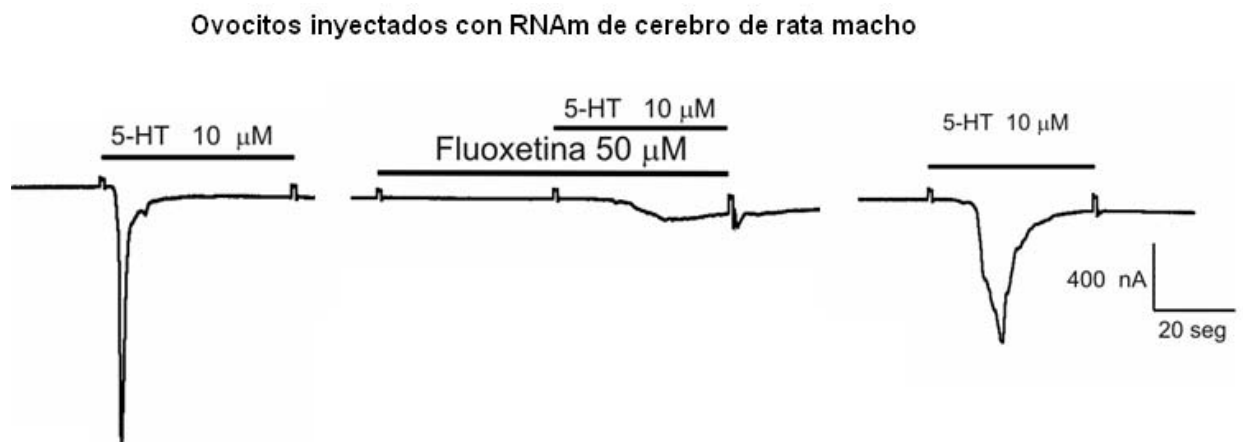


Fig. 15. Inhibición de la corriente generada por 5-HT en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Los trazos ilustran las respuestas provocadas por la aplicación de

5-HT 10 μ M tanto en la ausencia (primer trazo) como en presencia de fluoxetina 50 μ M (segundo trazo) en un ovocito inyectado con RNAm. La coaplicación con la droga provocó una inhibición de $91.12 \pm 5.36\%$ que fue revertida después de un lavado de 3 min hasta en un $58.5 \pm 15.23\%$ (tercer trazo). Resultados semejantes fueron obtenidos en 5 ovocitos de 2 donadores diferentes. Los ovocitos fueron controlados a un potencial de -60 mV en éste y los experimentos subsecuentes.

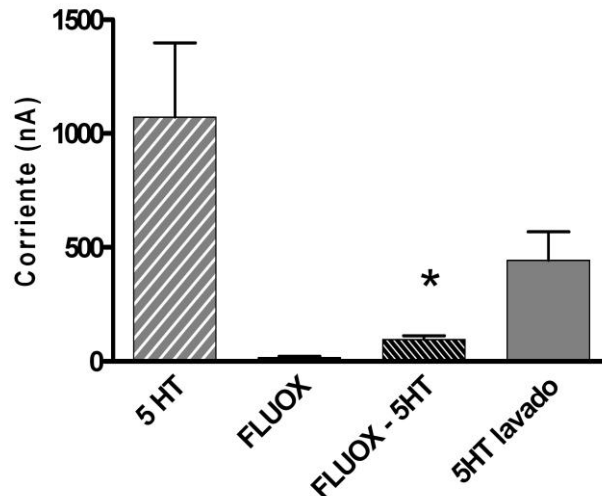


Fig. 16. Efecto de la fluoxetina sobre la corriente generada por 5-HT en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Resumen de los experimentos realizados con el protocolo ilustrado en la Fig. 15; las barras representan la media \pm SEM de la amplitud de corriente alcanzada en cada uno de los tratamientos señalados. Prueba ANOVA de una vía medidas repetidas $p < 0.05$, prueba Tukey $p < 0.001$.

Efecto de fluoxetina sobre la corriente provocada por GABA

En ovocitos desfoliculados de *Xenopus laevis* no se presentó activación de corrientes generadas con la aplicación de GABA 10 μ M, indicando que los ovocitos no presentan receptores de GABA nativos. En ovocitos inyectados con el RNAm de cerebro durante la aplicación de GABA 10 μ M fue observada una corriente entrante con un promedio de 127 ± 73 nA; en los mismos ovocitos, la aplicación de fluoxetina 50 μ M provocó una corriente entrante de 37.5 ± 61 nA y en algunas ocasiones no se observó efecto alguno. Con la coaplicación de fluoxetina 50 μ M y GABA 10 μ M en solución Ringer se

observó una potenciación de la corriente a GABA obteniendo valores en promedio de 185 ± 121 nA correspondiente a una potenciación de $45.67 \pm 40.94\%$ con respecto a la corriente inicial de GABA.

Después de un lavado con solución externa, al aplicar nuevamente GABA $10 \mu\text{M}$ fue observada la activación de la corriente mostrando una eliminación total del efecto potenciador, restituyendo la corriente inicial.

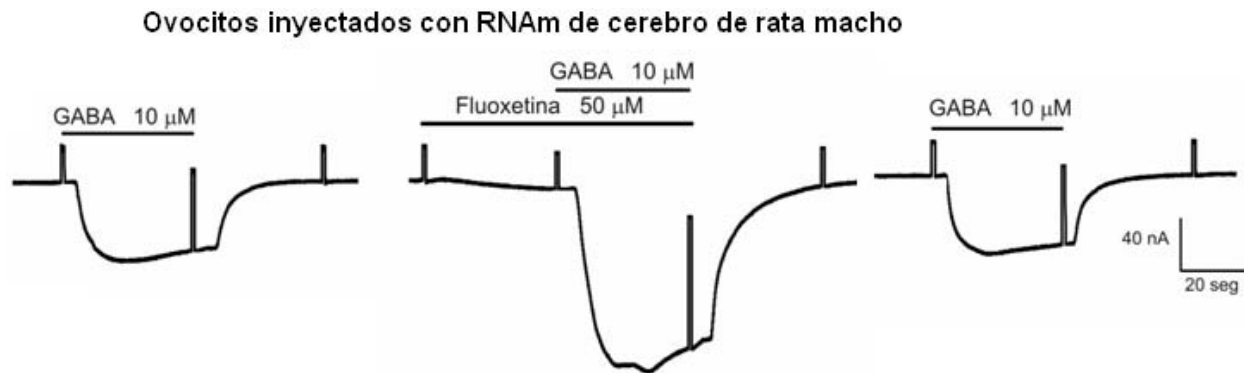


Fig. 17. Potenciación de la corriente generada por GABA en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Los trazos ilustran las respuestas provocadas por la aplicación de GABA $10 \mu\text{M}$ tanto en la ausencia (primer trazo) como en presencia de fluoxetina $50 \mu\text{M}$ (segundo trazo) en un ovocito inyectado con RNAm. La coaplicación con la droga provocó una potenciación de $45.67 \pm 40.94\%$ que fue revertida completamente después de un lavado de 3 min (tercer trazo). Resultados semejantes fueron obtenidos en 11 ovocitos de 2 donadores diferentes.

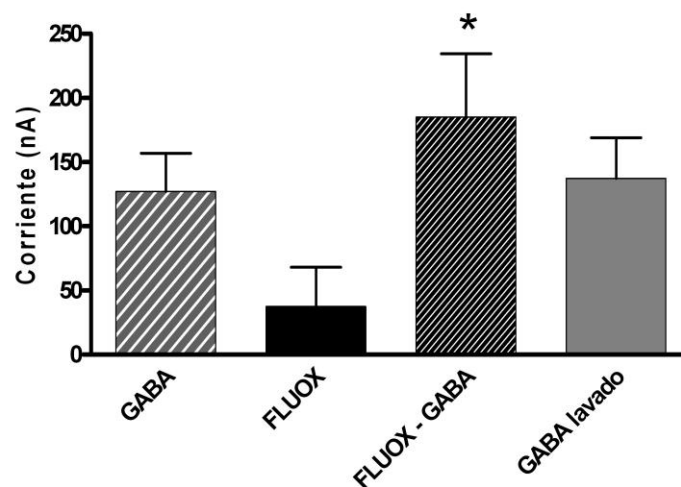


Fig. 18. Fluoxetina potencia la corriente generada por GABA en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Resumen de los experimentos realizados con el protocolo ilustrado en la Fig. 17; las barras representan la media \pm SEM de la amplitud de corriente alcanzada en cada uno de los tratamientos señalados. Prueba ANOVA de una vía medidas repetidas $p < 0.05$, prueba Tukey $p < 0.01$.

Efecto de fluoxetina sobre la corriente provocada por ACh

Los ovocitos defoliculados de *Xenopus laevis* en algunas ocasiones expresan receptores nativos a ACh; sin embargo, durante este trabajo no fue observada esta expresión. En ovocitos expresando el RNAm de cerebro con la aplicación de ACh 10 μ M fue observada una corriente promedio de 194 ± 47.5 nA, mientras que en la aplicación de fluoxetina 50 μ M generó en algunos casos una corriente entrante de aproximadamente 7 nA. La coaplicación de fluoxetina 50 μ M y ACh 10 μ M provocó una inhibición de la corriente generada obteniendo valores en promedio de 81 ± 31.1 nA que correspondió a una inhibición de $58.25 \pm 15.99\%$ con respecto a la corriente inicial.

Después del lavado con solución Ringer por 180 seg, la aplicación nuevamente de ACh 10 μ M mostró una recuperación total con respecto a la corriente inicial previa a la perfusión con fluoxetina.

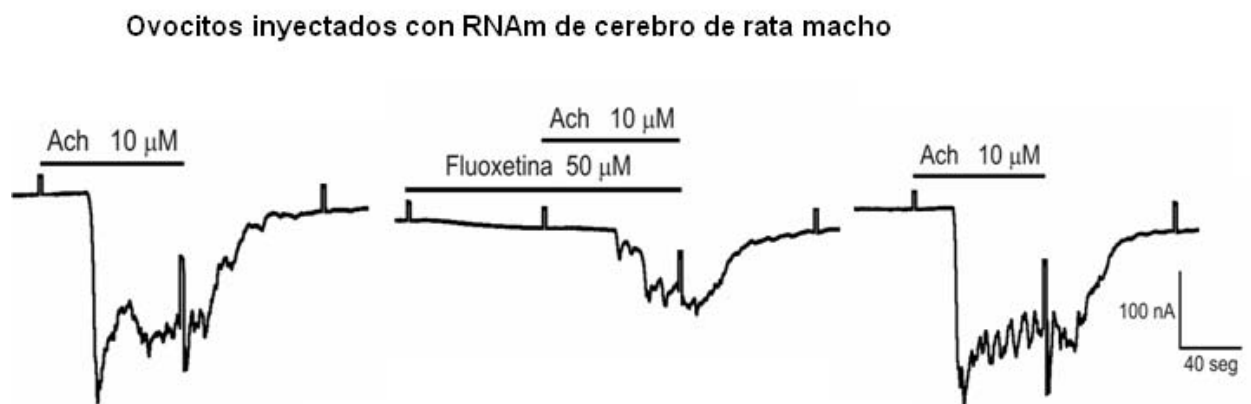


Fig. 19. Efecto de la fluoxetina sobre la corriente generada por ACh en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Los trazos ilustran las respuestas provocadas por

la aplicación de ACh 10 μ M tanto en la ausencia (primer trazo) como en presencia de fluoxetina 50 μ M (segundo trazo) en un ovocito inyectado con RNAm. La coaplicación con la droga provocó una inhibición de $58.25 \pm 15.99\%$ que fue revertida después de un lavado de 3 min (tercer trazo). Resultados semejantes fueron obtenidos en 3 ovocitos de 2 donadores. Los ovocitos fueron controlados a un potencial de -60 mV en éste y los experimentos subsiguientes.

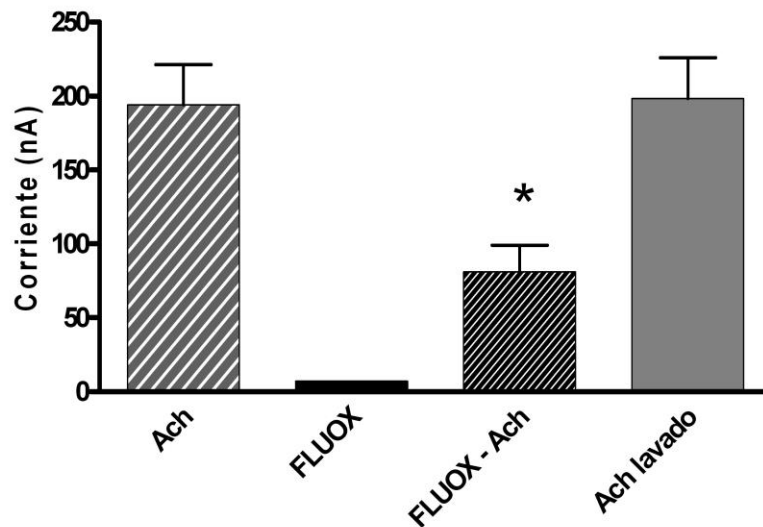


Fig. 20. Fluoxetina inhibe la corriente generada por ACh en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Resumen de los experimentos realizados con el protocolo ilustrado en la Fig. 19; las barras representan la media \pm SEM de la amplitud de corriente alcanzada en cada uno de los tratamientos señalados. Prueba ANOVA de una vía medidas repetidas $p < 0.05$, prueba Tukey $p < 0.01$.

Efecto de fluoxetina sobre la corriente provocada por Glut

Los ovocitos desfolículos de *Xenopus laevis* no presentaron activación de corriente al aplicar Glut, indicando que los ovocitos no presentaron receptores de Glut nativos. En los ovocitos expresando el RNAm cerebral se observó una corriente entrante en respuesta a la aplicación de Glut 10 μ M con dos componentes a las que les llamamos 1^o y 2^o pico de corriente, estas tuvieron un promedio de amplitud de 217 ± 140 nA y 413 ± 271 nA. La aplicación de sólo fluoxetina 50 μ M no indujo una corriente u ocasionalmente generó una corriente entrante de amplitud pequeña siendo de 13 ± 8.3

nA. Cuando la fluoxetina 50 μM fue aplicada junto con Glut 10 μM en solución Ringer, la respuesta a 5-HT fue inhibida por 51.3% y 34.5% sobre el pico 1 y 2 de la respuesta. Adicionalmente se observó una corriente oscilatoria entrante, típica de los receptores que activan la fosfolipasa C, lo cual nos indica que la fluoxetina pudiera estar actuando sobre receptores ionotrópicos y metabotrópicos.

Después de un lavado con solución Ringer, fue observado que la activación de la corriente a Glut 10 μM se recuperó en un 83.4% con respecto a la corriente inicial previo a la perfusión con fluoxetina.

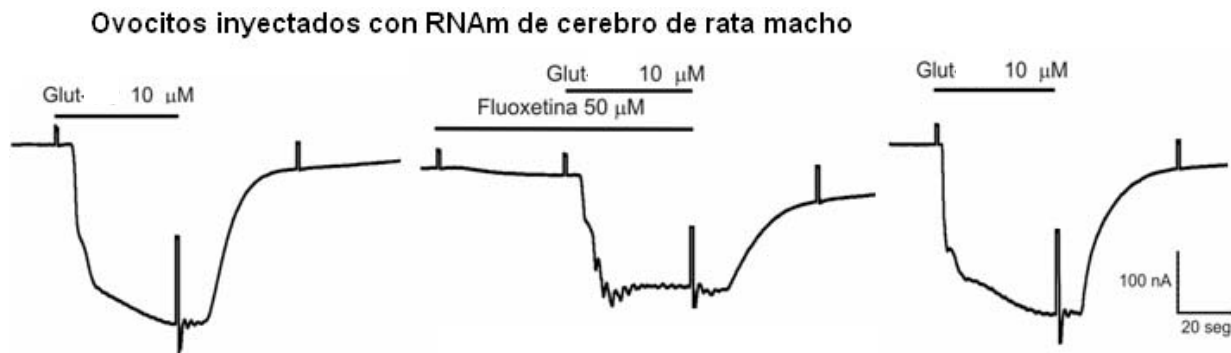


Fig. 21. Inhibición de la corriente generada por Glut en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Los trazos ilustran las respuestas provocadas por la aplicación de Glut 10 μM tanto en la ausencia (primer trazo) como en presencia de fluoxetina 50 μM (segundo trazo) en un ovocito inyectado con RNAm. La coaplicación con la droga provocó una inhibición de la corriente entrante en sus dos fases cinéticas, la corriente 1 y 2, además de la potenciación de una corriente entrante oscilatoria típica de la respuesta I_{ClCa} , esta respuesta fue revertida después de un lavado de 3 min (tercer trazo). Resultados semejantes fueron obtenidos en 10 ovocitos de 2 donadores diferentes.

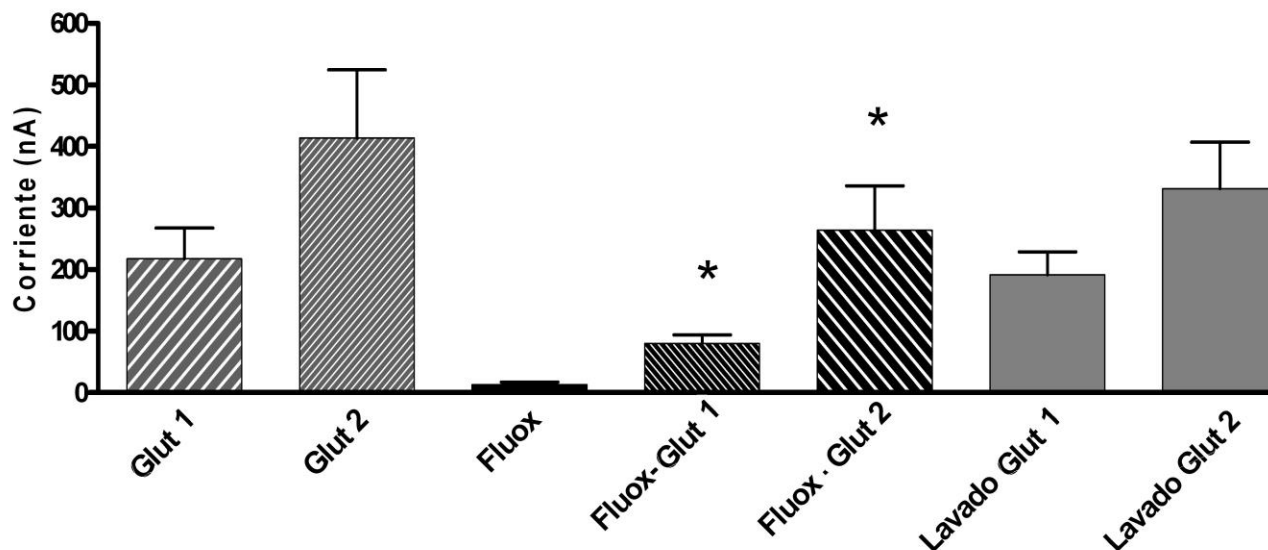


Fig. 22. Fluoxetina inhibe la corriente generada por Glut en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Resumen de los experimentos realizados con el protocolo ilustrado en la Fig. 21; las barras representan la media \pm SEM de la amplitud de corriente alcanzada en cada uno de los tratamientos señalados. Prueba ANOVA de una vía medidas repetidas $p < 0.05$, prueba Tukey $p < 0.05$.

Efecto de fluoxetina sobre la corriente provocada por ácido kaínico

Los ovocitos expresando el RNAm de cerebro mostraron una corriente entrante con un promedio de 567.5 ± 210 nA en respuesta a la aplicación de ácido kaínico (AK) $50 \mu\text{M}$. La aplicación de fluoxetina $50 \mu\text{M}$, como en los demás casos, ocasionalmente generó una corriente entrante de amplitud pequeña. Al momento de perfundir fluoxetina $50 \mu\text{M}$ junto con AK $50 \mu\text{M}$, la respuesta fue ligeramente disminuida obteniendo valores en promedio de 441.75 ± 152 nA correspondiente a una inhibición de $22.16 \pm 14.38\%$ con respecto a la corriente inicial en la que se aplicó únicamente AK $50 \mu\text{M}$.

Después de un lavado con solución Ringer, se observa la activación de la corriente a AK $50 \mu\text{M}$ con una recuperación total.

Ovocitos inyectados con RNAm de cerebro de rata macho

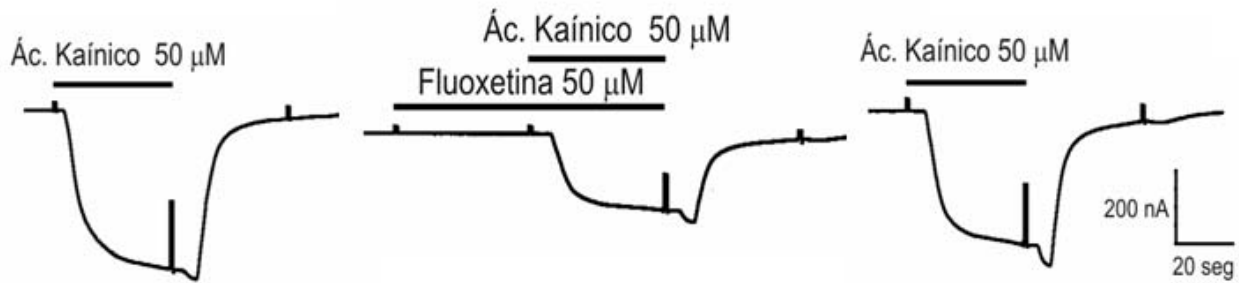


Fig. 23. Inhibición de la corriente generada por AK en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Los trazos ilustran las respuestas provocadas por la aplicación de ác. Kaínico 50 μM tanto en la ausencia (primer trazo) como en presencia de fluoxetina 50 μM (segundo trazo) en un ovocito inyectado con RNAm. La coaplicación con la droga provocó una inhibición de $22.16 \pm 14.38\%$ que fue revertida después de un lavado de 3 min (tercer trazo). Resultados semejantes fueron obtenidos en 4 ovocitos de 2 donadores diferentes.

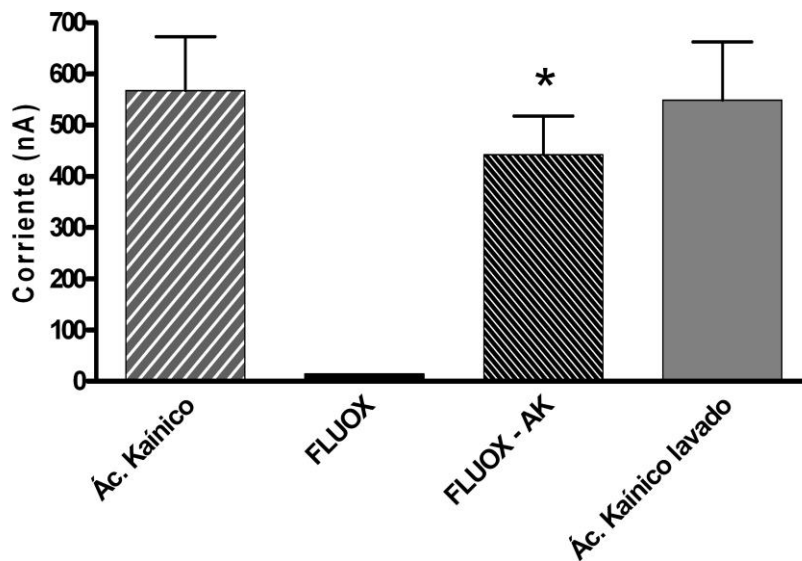


Fig. 24. Fluoxetina inhibe la corriente generada por Ác. kaínico en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Resumen de los experimentos realizados con el protocolo ilustrado en la Fig. 23; las barras representan la media \pm SEM de la amplitud de corriente alcanzada en cada uno de los tratamientos señalados. Prueba ANOVA de una vía medidas repetidas $p < 0.05$, prueba Tukey $p < 0.001$.

Efecto de fluoxetina sobre la corriente T_{out}

Los ovocitos desfoliculados de *Xenopus laevis* poseen canales de Cl^- activados por Ca^{++} ; el Ca^{++} puede entrar al ovocito a través de canales de Ca^{++} dependientes del voltaje generando la corriente llamada T_{out} (Miledi, 1982). Para generar la corriente T_{out} el voltaje fue mantenido inicialmente a -100 mV y fueron aplicados pulsos desde -40 mV a $+60$ mV, en incrementos de 20 mV. En ovocitos expresando el RNAm de cerebro la aplicación de Ringer alto Ca^{++} 10 mM y con pulsos despolarizantes se obtuvieron amplitudes de T_{out} de $9.79 \pm 3.6 \mu A$ durante el pulso a $+20$ mV; al aplicar fluoxetina $50 \mu M$ en Ringer Ca^{++} 10 mM durante un minuto, el mismo protocolo de pulsos generó amplitudes de T_{out} de $6.16 \pm 1.4 \mu A$, correspondiente a una inhibición de $37.08 \pm 11.38\%$. La amplitud de la corriente T_{out} fue recuperada después del lavado de la droga (Fig. 25).

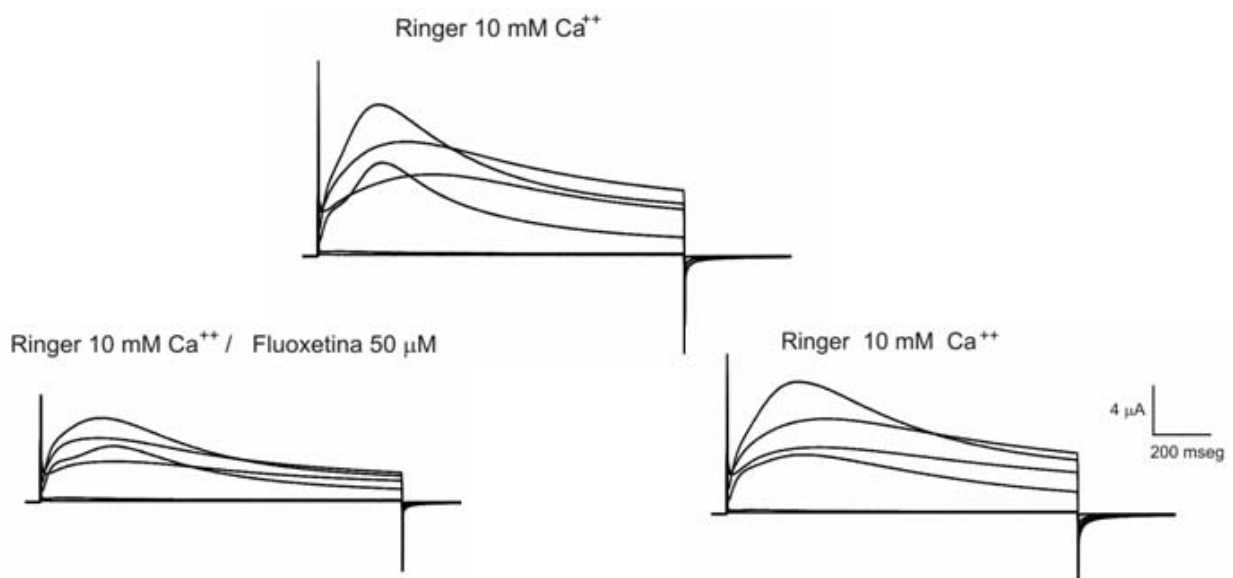


Fig. 25. Inhibición de la corriente T_{out} por fluoxetina en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro. Los trazos ilustran las respuestas provocadas por la aplicación de Ringer 10 mM Ca^{++} tanto en la ausencia (primer trazo) como en presencia de fluoxetina $50 \mu M$ (segundo trazo) en un ovocito inyectado con RNAm. La coaplicación con la droga provocó una inhibición de $37.08 \pm 11.38\%$ que fue revertida después de un lavado de 7 min (tercer trazo).

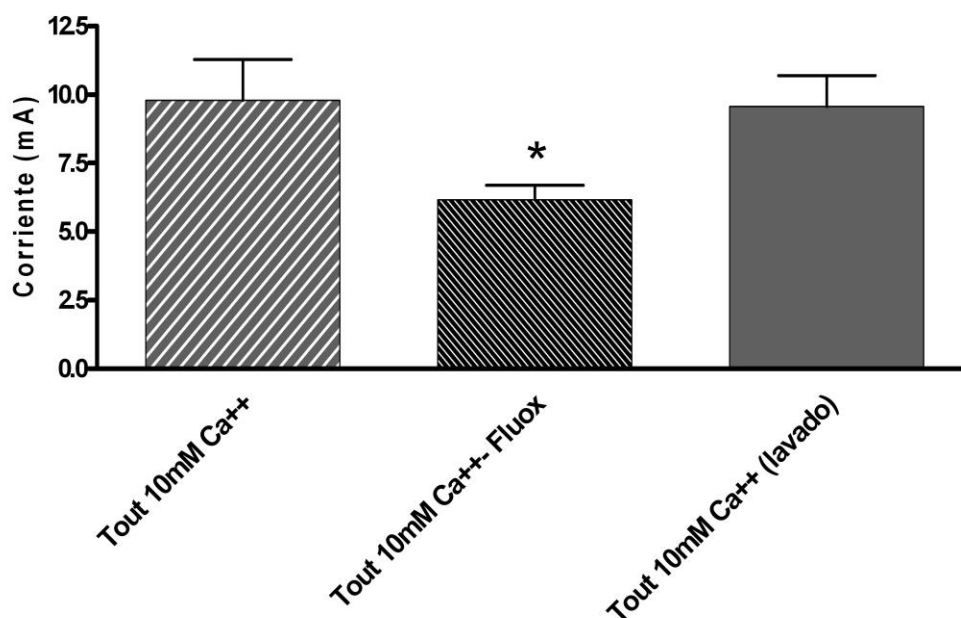


Fig. 26. Fluoxetina inhibe la corriente T_{out} , en ovocitos de *Xenopus laevis*, expresando RNAm de cerebro. Resumen de los experimentos realizados con el protocolo ilustrado en la Fig. 25; las barras representan la media \pm SEM de la amplitud de corriente alcanzada en cada uno de los tratamientos señalados. Prueba ANOVA de una vía medidas repetidas $p < 0.05$, prueba Tukey $p < 0.05$.

8 DISCUSIÓN

El estudio de los blancos moleculares de drogas diversas ha requerido la implementación de estrategias basadas en diferentes principios las cuales generan resultados que no pueden ser comparables entre sí, además de no ser empleados de manera sistemática para analizar de manera funcional la interacción droga-proteína.

En este trabajo se propuso desarrollar un método basado en la expresión heteróloga de diferentes proteínas de membrana en el ovocito de *Xenopus laevis* a través de la inyección del RNAm de cerebro de rata para evaluar de manera sistemática la interacción de una droga con diferentes blancos moleculares empleando técnicas electrofisiológicas. La droga elegida para probar este método fue la fluoxetina (Prozac),

una droga indicada ampliamente para el tratamiento de la depresión, una enfermedad de alto impacto en la sociedad mundial.

La fluoxetina cuyo sitio de acción se ha reportado ser específico para el transportador de serotonina, es capaz de unirse a otros blancos moleculares como ha sido reportado por diferentes autores. Estas evidencias; sin embargo, a veces son contradictorias debido tal vez al método de medición utilizado.

Es por ello que el trabajo aquí presentado es de gran relevancia ya que permitió medir de manera sistemática los efectos de la fluoxetina sobre diferentes blancos moleculares.

El RNAm de cerebro inyectado en el ovocito de *Xenopus laevis* indujo la expresión de receptores serotoninérgicos en la membrana de esta célula como fue demostrado al aplicar la 5-HT la cual generó una corriente entrante. Sin embargo, la fluoxetina inhibió esta respuesta hasta en un 91.12%, demostrando que tiene un efecto bloqueador sobre los receptores serotoninérgicos expresados en el ovocito. Estos resultados refuerza los resultados obtenidos por Ni y Miledi (1997).

El sistema serotoninérgico presenta una interacción con el sistema colinérgico (Gerschenfeld and Stefani, 1966). Por este motivo se han realizado estudios para poder evaluar la interacción que tiene la fluoxetina con receptores colinérgicos. En el sistema colinérgico se tienen 2 tipos de receptores: nicotínicos y muscarínicos. Los receptores nicotínicos tienen una respuesta excitatoria y pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos; los receptores muscarínicos son de respuesta excitatoria o inhibitoria y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G.

Cuando se inyectó el RNAm en los ovocitos, se observó que éstos también expresaron receptores muscarínicos como lo demostró la generación de corrientes oscilatorias después de la aplicación de acetilcolina. Estas oscilaciones implican la liberación de Ca^{2+} intracelular mediada por receptores metabotrópicos. Estas corrientes fueron

inhibidas en un 58.25% por la fluoxetina. Aún cuando existen evidencias que muestran que la fluoxetina inhibe receptores nicotínicos (García Colunga et al., 1997), esta es la primera vez que se demuestra su efecto sobre receptores muscarínicos.

En 1999, fueron realizados estudios de unión demostrando que la fluoxetina interacciona con el receptor GABA_A (Tunnicliff et al., 1999). Posteriormente se realizaron estudios funcionales en la línea celular HEK-293T transfectada para expresar receptores GABA_A que demostraron un incremento en la respuesta dependiente de la dosis de fluoxetina. Se describió también que la sensibilidad de la respuesta a fluoxetina estaba relacionada con el tipo de subunidad del receptor GABA expresado (Robinson et al., 2003; Derry et al., 2007). Sin embargo, en estudios de unión no se encontró afinidad de fluoxetina con el receptor GABA_A en un cultivo neuronal de corteza (Werling et al., 2007)

En nuestro modelo de expresión de RNAm de cerebro en *Xenopus laevis* demostramos que la fluoxetina presenta un efecto potenciador reversible de 45.67% sobre la corriente de GABA.

Adicionalmente, se ha reportado que el sistema glutamatérgico se encuentra involucrado en el trastorno de la depresión (Zarate et al., 2002). Se ha reportado que la fluoxetina inhibe corrientes glutamatérgicas en células corticales en concentraciones bajas desde 10 μ M (Szasz et al., 2007).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de glutamato sobre los receptores expresados en el modelo de *Xenopus laevis*, se observó una inhibición significativa y reversible de la amplitud del primer pico de la corriente en 51.3%, este pico parece corresponder principalmente a la activación de canales tipo NMDA, ya que este componente de la corriente mostró una clara desensibilización, un comportamiento típico de este tipo de canales glutamatérgicos.

El segundo componente de la corriente glutamatérgica parece entonces ser debida principalmente a otros canales glutamatérgicos del tipo no-NMDA, como por ejemplo canales sensibles a kainato. De acuerdo a la bibliografía no se cuenta con un reporte funcional del efecto de la fluoxetina sobre los receptores a kainato. En el presente trabajo se observó que la fluoxetina también posee un efecto inhibitorio significativo en la corriente generada por ácido kaínico; este efecto fue de un 22% con una recuperación total. Estos datos nos sugieren que la fluoxetina posee como blancos moleculares a los receptores NMDA y de kainato neuronales.

Diversos estudios recientes indican que fluoxetina tiene efectos adicionales sobre distintos canales iónicos. Los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el RNAm también expresaron una gran cantidad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que activaron corrientes T_{out} ; sobre estas corrientes también la fluoxetina presentó importantes efectos inhibitorios que podrían ser atribuidos tanto a efectos sobre los canales de Ca^{2+} como sobre canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} .

En resumen la colección de moléculas analizadas provenientes de la expresión del RNAm de cerebro mostró que los diversos efectos de la fluoxetina sobre ellas no son dependientes del ambiente en que han sido estudiados, sino más bien a la unión específica de la droga sobre cada una de las entidades moleculares. Además mostramos que el ovocito de *Xenopus*, expresando de esta manera las proteínas de cerebro, es un modelo confiable para obtener en un ensayo único muchas de las moléculas receptoras y canales iónicos de interés, y para explorar su afinidad por drogas de las que no se sabe su blanco de acción, lo cual facilitará la búsqueda de estas entidades en experimentos dirigidos al reconocimiento de nuevos potenciales fármacos.

9 CONCLUSIONES

- 1) La fluoxetina presenta efectos sobre las proteínas co-expresadas en un modelo funcional bajo condiciones homogéneas y controladas. Dado los resultados obtenidos, los efectos inhibitorios o potenciadores inducidos por fluoxetina son validados en el modelo de expresión de RNAm de cerebro en *Xenopus laevis*.
- 2) Se demostró que la fluoxetina tiene interacciones directas con receptores neuronales de los sistemas serotoninérgico, glutamatérgico (receptores NMDA y kaínicos), muscarínico, gabaérgico y sobre canales iónicos expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Comparando lo reportado en la literatura con los datos obtenidos en este estudio, queda claro que el método de expresión heteróloga en el ovocito de *Xenopus laevis* permite obtener datos comparables y reproducibles.

10 PERSPECTIVAS

El método aquí propuesto basado en la expresión heteróloga de proteínas de membrana en el ovocito de *Xenopus laevis* podría ser empleado de manera sistemática para la búsqueda de blancos moleculares de drogas diversas. Si este sistema se acoplara además al empleo de técnicas modernas de proteómica, tendría un alto potencial en el estudio de la interacción drogas y proteínas.

11 REFERENCIAS

- Altamura AC, Moro AR y Percudani M. 1994. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin. Pharmacokinet.* 26: 201-214.
- Andersen J, Taboureau O, Hansen KB, Olsen L, Egebjerg J, Stromgaard K, Kristensen AS. 2009. Location of the antidepressant binding site in the serotonin transporter: importance of Ser-438 in recognition of citalopram and tricyclic antidepressants. *J. Biol. Chem.* 284: 10276-10284.
- Arellano R, Garay E, Miledi R. 1998. Cl-currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology.* 43: C333-C340.
- Ban TA. 2006. The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8: 335-344.
- Barbon A, Popoli M, La Via L, Moraschi S, Vallini I, Tardito D, Tiraboschi E, Mausazzi L, Giambelli R, Gennarelli M, Racagni G y Barlati S. 2006. Regulation of editing and expression of glutamate α -amino-propionic-acid (AMPA)/kainate receptors by antidepressant drugs. *Biol. Psychiatry.* 59: 713-720.
- Chen Y, Peng L, Zhang X, Stolzenburg JU y Hertz L. 1995. Further evidence that fluoxetine interacts with a 5-HT_{2C} receptor in glial cells. *Brain Res. Bull.* 38: 153–159.
- Chomczynski P y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
- Dahlstrom A y Fuxe K. 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 62 (suppl 232): 1-55.
- Dailey JW, Yan QS, Mishra PK, Burger RL y Jobe PC. 1992. Effects of fluoxetine on convulsions and on brain serotonin as detected by microdialysis in genetically epilepsy-prone rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 533-540.
- Deák F, Lasztóczy B, Pacher P, Petheö GL, Valéria Kecskeméti y Spät A. 2000. Inhibition of voltage-gated calcium channels by fluoxetine in rat hippocampal pyramidal cells. *Neuropharmacology.* 39: 1029-36.

- Derry J, Paulsen I, Davies M y Dunn S. 2007. A single point mutation of the GABA_A receptor α 5-subunit confers fluoxetine sensitivity. *Neuropharmacology* 52: 497-505.
- Ellis PM y Salmond C. 1994. Is platelet imipramine binding reduced in depression? A meta-analysis. *Biol. Psychiatry*. 36: 292-299.
- Fuller RW, Perry KW, Snoddy HD y Molloy BB. 1974. Comparison of the specificity of 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine and chlorimipramine as amine uptake inhibitors in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 28: 233-236.
- García-Colunga J, Awad JN y Miledi R. 1997. Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2041–2044.
- Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PP, Branchek TA. 1995. The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J.* 14: 2806-15.
- Gerschenfeld NM y Stefani E. 1966. An electrophysiological study of 5-hydroxytryptamine receptors of neurones in the molluscan nervous system. *J. Physiol.* 185: 684-700.
- Goudi AJ, Thornton EW y Wheeler TJ. 1976. Effects of Lilly 110140, a specific inhibitor of 5-hydroxytryptamine uptake, on food intake and on 5-hydroxytryptophan-induced anorexia. Evidence for serotonergic inhibition of feeding. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 318-320.
- Gram L. 1994. Fluoxetine. *N. Engl. J. Med.* 331: 1354-1361.
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR y Mairbaix G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cell. *Nature* 233: 177-182.
- Hiemke C y Hartter S. 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. Therapeut.* 85: 11-28.
- Hille B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3ª edición. U.S.A. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Hirono C, Ito I, Yamagishi S y Sugiyama H. 1988. Characterization of glutamate receptors induced in *Xenopus* oocytes after injection of rat brain mRNA. *Neurosci. Res.* 6: 106-114.

- Koch S, Perry KW, Nelson DL, Conway RG, Threlkeld PG y Bymaster FP. 2002. R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: An in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology*. 27: 949-959.
- Maertens C, Wei L, Voets T, Droogmans G y Nilius B. 1999. Block by fluoxetine of volume-regulated anion channels. *Br. J. Pharmacol.* 126: 508–514.
- Mandrioli R, Mercolini L, Saracino MA, Raggi MA. 2012. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs): therapeutic drug monitoring and pharmacological interactions. *Current Med. Chem.* 19: 1846-1863.
- McGuirk J, Muscar R y Willner P. 1992. Effects of chronically administered fluoxetine and fenfluramine on food intake, body weight and the behavioural satiety sequence. *Psychopharmacology*. 106: 401-407.
- Medina-Mora ME, Borges G, Lara Muñoz C, Benjet C, Blanco Jaimes J, Fleiz Bautista C. 2003. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la encuesta nacional de epidemiología psiquiátrica en México. *Saludo Mental*. 26: 1-16.
- Miledi R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes, *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 215: 491–497.
- Miledi R, Parker I y Sumikawa K. 1982. Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocyte. *EMBO. J.* 1: 1307-1312.
- Ni YG y Miledi R. 1997. Blockage of 5-HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2036–2040.
- Park KS, Kong ID, Park KC y Lee JW. 1999. Fluoxetine inhibits L-type Ca²⁺ and transient outward K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Yonsei Med. J.* 40: 144-151.
- Parker I, Gundersen CB y Miledi R. 1985. Intracellular Ca²⁺ dependent and Ca²⁺ independent responses of rat brain serotonin receptors transplanted to *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Res.* 2: 491-496.
- Robinson R, Drafts B y Fisher J. 2003. Fluoxetine increases GABA_A receptor activity through a novel modulatory site. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 978-984.

- Stafford R, MacDonald E y Finkelstein S. 2001. National patterns of medication treatment for Depression, 1987 to 2001. *J. Clin. Psychiatry.* 3: 232-235.
- Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L y Rajkowska G. 1998. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression--postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J. Neurosci.* 18: 7394-7401.
- Sweetman SC, Ed. 2004. *Martindale – The Complete Drug Reference 34th edition.* London: Pharmaceutical Press.
- Szasz B, Mike A, Karoly R, Gerevich Z, Illes P, Vizi E y Kiss J. 2007. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biol. Psychiatry* 62: 1303-1309.
- Traboulsie A, Chemin J, Kupfer E, Nargeot J y Lory P. 2006. T-type calcium channels are inhibited by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Mol. Pharmacol.* 69: 1963-1968.
- Tunnicliff G, Schindler NL, Crites GJ, Goldenberg R, Yochum A y Malatynska E. 1999. The GABA(A) receptor complex as a target for fluoxetine action. *Neurochem. Res.* 24: 1271-1276.
- Tytgat J, Maertens C y Daenens P. 1997. Effect of fluoxetine on a neuronal, voltage-dependent potassium channel (Kv1.1). *Br. J. Pharmacol.* 122:1417–1424.
- Werling L, Keller A, Frank J y Nuwayhid S. 2007. A comparison of the binding profile of dextromethorphan, memantine, fluoxetine and amitriptyline: Treatment of involuntary emotional expression disorder. *Exp. Neurol.* 207: 248-257.
- Wong DT, Horng JS, Bymaster FP, Hauser KL y Molloy BB. 1974. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci.* 15: 471-479.
- Wong DT, Bymaster FP, Horng JS y Molloy BB. 1975. 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 193: 804-811.
- Wong DT, Perry KW y Bymaster FP. 2005. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac) *Nature Rev. Drug Discov.* 4: 764-774.
- Wood A, Tollefson GD y Birkett M. 1993. Pharmacotherapy of obsessive compulsive disorder--experience with fluoxetine. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 8: 301-306.

- World Health Organization Report, 2003.
- Ye Z, Lu Y, Sun H, Cheng X, Xu T y Zhou J. 2008. Fluoxetine inhibition of glycine receptor activity in rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1239: 77-84.
- Zarate CA, Quiroz J, Payne J y Manji HK. 2002. Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. *Psychopharmacol. Bull.* 36: 35– 83.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hipótesis monoaminérgica	6
Figura 2. Estructura de Serotonina (5-HT).....	7
Figura 3. Síntesis y degradación de serotonina	8
Figura 4. Procesos asociados a la transmisión serotoninérgica	10
Figura 5. Topología del transportador de 5-HT	11
Figura 6. Estructura química de Fluoxetina (a) y sus metabolitos Norfluoxetina (b) y p-Trifluorometilfenol (c).....	15
Figura 7. Extracción de RNA total por el método de Chomczynski&Sacchi	24
Figura 8. Esquema de la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos....	27
Figura 9. Electroforesis del RNA total purificado del cerebro de rata	29
Figura 10. Fotografía de gel de agarosa a una concentración de 1.4%	30
Figura 11. Registro electrofisiológico en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con 50 nl de agua estéril.....	31
Figura 12. Respuestas eléctricas generadas por neurotransmisores en ovocitos inyectados con RANm de cerebro.....	32
Figura 13. Respuestas T_{out} en ovocitos control y ovocitos inyectados con RNAm ..	33
Figura 14. Corriente T_{out} en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	34
Figura 15. Inhibición de la corriente generada por 5-HT en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	36
Figura 16. Efecto de la fluoxetina sobre la corriente generada por 5-HT en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	36
Figura 17. Potenciación de la corriente generada por GABA en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	37
Figura 18. Fluoxetina potencia la corriente generada por GABA en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	38
Figura 19. Efecto de la fluoxetina sobre de la corriente generada por ACh en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	39
Figura 20. Fluoxetina inhibe la corriente generada por ACh en ovocitos inyectados con	

RNAm de cerebro.....	39
Figura 21. Inhibición de la corriente generada por Glut-Gly en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	40
Figura 22. Fluoxetina inhibe la corriente generada por Glut-Gly en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	41
Figura 23. Inhibición de la corriente generada por AK en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	42
Figura 24. Fluoxetina inhibe la corriente generada por Ác. kaínico en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	42
Figura 25. Inhibición de la corriente T_{out} por fluoxetina en ovocitos inyectados con RNAm de cerebro.....	43
Figura 26. Fluoxetina inhibe la corriente T_{out} , en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> , expresando RNAm de cerebro.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de la depresión mayor de acuerdo al DSM-IV	4
Tabla 2. Tipos de receptores 5-HT y su relación con estructuras moleculares	9
Tabla 3. Acción serotoninérgica	12
Tabla 4. Sitios de unión de fluoxetina detectados por ensayo de competencia con agonistas o antagonistas específicos al receptor indicado.....	20