



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“Desarrollo de una estrategia para la identificación de los blancos moleculares de drogas utilizando expresión heteróloga de proteínas de membrana en ovocitos de *Xenopus*”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

Q.F.B. Magali Arisaí León Fuentes

DIRECCIÓN DE TESIS:

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Campus Juriquilla, Querétaro. Agosto de 2011.



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 Magali Arisaí León Fuentes, cuyo título es: “Desarrollo de una estrategia para la identificación de los blancos moleculares de drogas utilizando expresión heteróloga de proteínas de membrana en ovocitos de *Xenopus*” 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:

Dra. Maricela Luna Muñoz

Secretario (Tutor):

Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas

Vocal:

Dr. César Ibarra Alvarado

Suplente:

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Suplente:

Dr. Michael C. Jeziorski

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán
Coordinadora del Programa
Maestría en Ciencias (Neurobiología)

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, No. de cuenta: 510002037.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Becario No. 234207), por el apoyo económico que me otorgó durante la realización de mis estudios de Maestría.

A mis tutores, Dr. Rogelio Arellano Ostoia y Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas, por creer en mí, hacerme parte de esta investigación y contribuir a mi formación científica y académica.

A los miembros del comité tutor, Dra. Aurea Orozco Rivas y Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, por revisar y enriquecer mi trabajo semestre a semestre con sus acertadas críticas y opiniones.

A los miembros del jurado, Dra. Maricela Luna Muñoz, Dr. César Ibarra Alvarado, Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez y Dr. Michael C. Jeziorski, que tan amablemente revisaron la tesis y aportaron valiosas sugerencias y comentarios.

Al laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, que dirige el Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por permitirme usar sus instalaciones para los experimentos de radiactividad.

A todos los miembros del laboratorio D-13 (Neurofisiología Celular) del Instituto de Neurobiología de la UNAM, que dirige el Dr. Rogelio Arellano Ostoia, por toda la ayuda técnica y académica que me brindaron durante estos dos años.

A mi familia y amigos, en especial a mis padres y a mis hermanas, que son mi más grande apoyo.

Y lo más importante, gracias a Dios, que es mi luz, mi guía y la fortaleza de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	i
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Mecanismos de la acción farmacológica	3
2.2 Interacción fármaco-blanco	5
2.3 Identificación de blancos moleculares	8
2.4 La fluoxetina	9
2.5 La depresión y el sistema monoaminérgico	11
2.6 Transportadores de monoaminas: el SERT	13
2.7 La fluoxetina y sus blancos moleculares	14
2.8 La escopolamina	17
2.9 Nuevos métodos de identificación de blancos moleculares	19
2.10 Búsqueda de interacciones ligando-blanco utilizando ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Obtención y microinyección de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	24
6.2 Síntesis de cRNA de P2X4-GFP, SERT y M1	24
6.3 Obtención de membranas de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	25
6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot	26
6.5 Registro electrofisiológico por control de voltaje	27
6.6 Marcaje de fotoafinidad sobre el SERT	28
6.7 Marcaje de afinidad sobre el receptor M1	31
6.8 Fluorografía	32
6.9 Búsqueda de interacciones ligando-blanco en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	32

7. RESULTADOS	33
7.1 Estandarización de la obtención de membranas de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> utilizando ovocitos nativos e inyectados	33
7.2 Estandarización del marcaje de fotoafinidad con [³ H]-F, utilizando proteínas de membrana provenientes de ovocitos nativos e inyectados con el cRNA de la proteína marcadora SERT	36
7.3 Estandarización del marcaje de afinidad con [³ H]-NMS, utilizando proteínas de membrana provenientes de ovocitos nativos e inyectados con el cRNA de la proteína marcadora M1	40
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	50
10. REFERENCIAS	50
11. LISTA DE FIGURAS	55
12. LISTA DE TABLAS	56

RESUMEN

El presente proyecto tiene como propósito principal aportar conocimiento para el desarrollo de un nuevo método de identificación de blancos moleculares de fármacos. Se consideró que el antidepresivo fluoxetina era una opción adecuada para validar la metodología que proponemos, debido a su importancia clínica y a los antecedentes sobre la afinidad que tiene por otros receptores, distintos a su blanco canónico, el transportador de serotonina. También utilizamos la escopolamina como ejemplo de un fármaco conocido que inhibe receptores muscarínicos de forma específica.

Utilizamos ovocitos de rana *Xenopus laevis* como modelo de expresión heteróloga de proteínas de membrana del sistema nervioso central. Se aislaron membranas totales de estos ovocitos para realizar marcajes de afinidad con fármacos radiomarcados: fluoxetina y escopolamina. Para identificar las proteínas que unieron al ligando, se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía. Con el fin de estandarizar la purificación de membranas, expresamos al receptor P2X4 fusionado a la proteína verde fluorescente; se comprobó su expresión y obtención mediante microscopía de fluorescencia y Western blot, respectivamente. Para la estandarización del marcaje, se utilizaron ovocitos expresando el transportador de serotonina o el receptor muscarínico M1; la expresión de ambas proteínas fue corroborada por electrofisiología. Los resultados obtenidos muestran que se requiere de un mayor número de experimentos para determinar las condiciones óptimas que permitan identificar los blancos por autorradiografía, sin embargo, indicaron que la sensibilidad de detección está dentro del rango que permitiría identificar la unión de fármacos a proteínas expresadas en la membrana del ovocito.

SUMMARY

This project aims to provide knowledge leading to the development of a new methodology that allows us to systematically identify potential molecular targets on which drugs act. It was felt that the antidepressant fluoxetine was an appropriate choice to validate the methodology that we propose due to its great clinical significance, as well as evidence of its affinity for receptors other than its canonical target, the serotonin transporter. We also used the drug scopolamine as an example of a well-known drug acting specifically on muscarinic receptors.

We used *Xenopus laevis* oocytes as a model for heterologous expression of membrane proteins of the central nervous system. Total membranes were isolated from these oocytes for affinity labeling with radioactive drugs: fluoxetine and scopolamine. To identify proteins that bound the ligand, we used polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. To standardize the purification of membranes, we expressed the P2X4 receptor fused to green fluorescent protein; expression and isolation were detected by fluorescence microscopy and Western blot, respectively. For the standardization of affinity labeling, oocytes expressing the serotonin transporter or the M1 muscarinic receptor were used; the expression of both proteins was confirmed by electrophysiology. The results show that more experiments are required to determine optimal conditions that allow target identification by autoradiography; however, the detection sensitivity appears to be within the range that would identify the drug binding to proteins expressed in the oocyte membrane.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas que enfrentan las ciencias farmacéuticas en la generación de nuevos fármacos es la falta de modelos biológicos adecuados que permitan determinar la naturaleza de los blancos moleculares sobre los que actúan las drogas. El presente proyecto tiene como propósito principal aportar conocimiento para el desarrollo de una nueva metodología que nos permita identificar de forma sistemática los posibles blancos moleculares sobre los que actúan fármacos nuevos y fármacos exitosos, ya comercializados, que aunque ampliamente estudiados y utilizados, puedan presentar al mismo tiempo interacciones moleculares secundarias que no se han reportado o identificado.

La propuesta central del proyecto toma ventaja de la afinidad que presentan las drogas por sus moléculas blanco. El concepto de esta interacción ligando-blanco es el factor común en la mayoría de las acciones farmacológicas: la unión con cierta especificidad del fármaco sobre algún componente molecular del organismo (Flórez et al., 2003). El método propuesto, llamado BILBOX (del acrónimo correspondiente a Búsqueda de Interacciones Ligando-Blanco en Ovocitos de *Xenopus*), utiliza ovocitos de *Xenopus laevis* como modelo de expresión heteróloga de proteínas de membrana del sistema nervioso central. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han corroborado que tras la microinyección citoplasmática de mRNA (messenger Ribonucleic Acid), purificado de cerebro de mamífero, el ovocito expresa diferentes proteínas de membrana del sistema nervioso central. El modelo permite estudiar, mediante técnicas electrofisiológicas, los efectos de una droga sobre distintos tipos de receptores farmacológicos que han sido expresados en un mismo ambiente celular y bajo las mismas condiciones fisiológicas (Morales-Toxqui, 2011). Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar el modelo de ovocito de *Xenopus laevis* para realizar marcajes de afinidad en membranas aisladas. La propuesta ahora es obtener las membranas purificadas del ovocito, las cuales contienen una gran diversidad de blancos moleculares, para someterlas a un marcaje de afinidad con ligandos marcados radiactivamente; esto consiste en un “entrecruzamiento” que genera uniones covalentes entre el fármaco radiactivo y los blancos por los cuales dicho fármaco tiene cierta afinidad. Esta interacción ligando-blanco puede ser visualizada, identificando la banda radiactiva, mediante métodos de separación de

proteínas (electroforesis) y autorradiografía. Finalmente, sería posible conocer la naturaleza del o los blancos moleculares con métodos de espectrometría de masas. Así, este nuevo método permitiría, en un solo ensayo, conocer distintos blancos moleculares de un fármaco.

En el presente proyecto el fármaco a estudiar fue la fluoxetina, clásicamente descrito como inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), pero que de acuerdo a varios estudios, se sugiere que presenta afinidad por otros receptores distintos al transportador de 5-HT (SERT) (Ni y Miledi, 1997; García-Colunga et al., 1997; Robinson et al., 2003; Szas et al., 2007; Ye et al., 2008; Keiser et al., 2009). Debido a los antecedentes reportados sobre la fluoxetina, se consideró una opción adecuada utilizar esta molécula como "sonda" para validar la metodología que proponemos. Además de la fluoxetina, se utilizó la escopolamina como una droga alternativa para ayudar a la estandarización del método. La escopolamina es un fármaco que ha sido ampliamente utilizado en experimentos farmacológicos, sobre todo en estudios de unión con radioligandos (Oki et al., 2005; Klinkenberg y Blokland, 2010). Dada la disponibilidad comercial de la droga es posible adquirirla fácilmente; su estructura química permite el estudio de un método de entrecruzamiento distinto al empleado para la fluoxetina y de acuerdo a los reportes publicados, es un fármaco antagonista específico de receptores muscarínicos. Estas características nos llevaron a elegir a la escopolamina como una segunda opción que nos daría información importante para el método que pretendemos implementar.

En este trabajo se realizaron los primeros experimentos para estandarizar la segunda parte del método BILBOX: se implementó exitosamente la obtención de las membranas de ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan proteínas de membrana del sistema nervioso central; después se realizaron marcajes de afinidad con fluoxetina y escopolamina tritiadas, utilizando dos métodos distintos de entrecruzamiento: luz ultravioleta y glutaraldehído, respectivamente. Los resultados de este trabajo avalan la potencialidad del sistema de expresión de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis* como una herramienta útil en la búsqueda de blancos moleculares de fármacos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mecanismos de la acción farmacológica

Los efectos de casi todos los fármacos son consecuencia de su interacción con componentes moleculares específicos del organismo, llamados receptores farmacológicos o blancos moleculares; dichas interacciones modifican la función del blanco y con ello inician los cambios bioquímicos y fisiológicos que caracterizan la reacción al fármaco. Esto último puede implicar, por ejemplo, la regulación de la expresión génica, la inhibición o la estimulación de sistemas de señalización intercelular, de sistemas de transporte transmembranal o de enzimas (Hardman y Limbird, 2004). Sin embargo, ciertos fármacos, por ejemplo los diuréticos osmóticos o los antiácidos, actúan gracias a sus propiedades fisicoquímicas y se dice que poseen un mecanismo de acción inespecífico (Lemke y Williams, 2008).

El concepto original de que los fármacos actúan sobre receptores se atribuye a John Newport Langley (1878). Langley se encontraba estudiando los efectos antagónicos de la atropina en la salivación inducida por pilocarpina y observó que “existe cierta sustancia o sustancias en las terminaciones nerviosas o las células glandulares con las que pueden formar complejos tanto la atropina como la pilocarpina”. Posteriormente, Langley llamó a este factor “sustancia receptora” (Hardman y Limbird, 2004).

El axioma básico de la farmacología establecido por Paul Ehrlich afirma que las moléculas de un fármaco dado deben ejercer alguna influencia química sobre uno o más componentes celulares para producir una respuesta farmacológica. Las moléculas del fármaco deben “unirse” a determinados componentes de las células para ejercer un efecto. Ehrlich lo resumía con las siguientes palabras: “corpora non agunt nisi fixata” (en el contexto moderno: “un fármaco no funcionará a menos que se una”) (Rang et al., 2004). El término “receptor” fue definido por primera vez en forma general por Ehrlich (1909) de la siguiente manera: “...el grupo combinable de la molécula protoplasmática con la que se une el grupo introducido se llamará de aquí en adelante receptor” (para una revisión detallada del tema ver el capítulo 1 de Hardman y Limbird, 2004).

Así, las moléculas con las que los fármacos son capaces de interactuar selectivamente, generándose como consecuencia de ello una modificación constante y específica en la función celular, se denominan receptores farmacológicos. Entre las moléculas celulares con capacidad de funcionar como receptores farmacológicos se encuentran aquellas que median la comunicación intercelular, es decir, los receptores de sustancias endógenas como los neurotransmisores y los cotransmisores, los neuromoduladores, las hormonas y otros mediadores endógenos que, liberados por una célula, tienen capacidad de influir sobre la actividad de otra. Los receptores son proteínas que se encuentran localizadas en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo celular. Entre las respuestas funcionales que los receptores pueden desencadenar destacan: a) modificaciones en la permeabilidad de iones y como consecuencia, en los potenciales bioeléctricos; b) cambios en la actividad de múltiples enzimas, cuando el mecanismo intracelular activado por el receptor regula componentes enzimáticos capaces de mediar la fosforilación de proteínas, la hidrólisis de fosfoinosítidos, la síntesis de AMP cíclico, etc.; y c) modificaciones en la síntesis y/o la estructura de diversas proteínas, en el caso de receptores con capacidad de modificar procesos transcripcionales y traduccionales (Flórez et al., 2003).

Sin embargo, existen fármacos cuyos efectos se producen en virtud de su interacción con elementos intracelulares y extracelulares los cuales son difíciles de considerar receptores en sentido estricto, pero que se comportan como elementos diana de estos fármacos. Dentro de este grupo se incluyen: a) los fármacos que actúan inhibiendo la actividad de diversas enzimas (por ejemplo, la monoamina oxidasa o la ciclooxigenasa); b) los quelantes, que fijan diversos cationes; c) los fármacos que actúan sobre canales iónicos voltaje dependientes; y d) los que interfieren en la actividad de bombas de transporte activo y moléculas transportadoras (por ejemplo, bomba de Na^+/K^+ y transportadores de monoaminas, respectivamente) (Rang et al., 2004; Flórez et al., 2003). En este trabajo se consideró conveniente utilizar el término “blanco molecular” para hacer referencia a cualquier componente molecular del organismo con el cual interactúa el fármaco, aunque las proteínas constituyen el grupo más importante desde el punto de vista numérico (Hardman y Limbird, 2004).

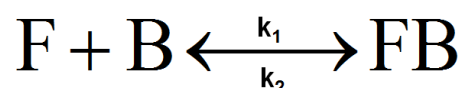
En general, la interacción fármaco-blanco se caracteriza por la generación de una respuesta en el sistema biológico como consecuencia del enlace del fármaco a la molécula blanco, hecho que se detalla a continuación.

2.2 Interacción fármaco-blanco

Los dos requisitos básicos de un fármaco son: la alta “afinidad” por su blanco molecular y la “especificidad”, gracias a la cual puede distinguir una molécula de otra, aún cuando exista una diversidad de variantes (Flórez et al., 2003).

La afinidad es una propiedad química que regula la unión del fármaco con su blanco y se rige por las fuerzas químicas que provocan la asociación reversible entre ellos. La afinidad se debe entonces a la formación de enlaces entre fármaco y blanco; el más frecuente es el iónico, pero puede reforzarse con otros enlaces como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals (interacciones bipolares) o interacciones hidrófobas; excepcionalmente se pueden formar enlaces covalentes que son los más firmes y que suelen originar interacciones irreversibles (Hardman y Limbird, 2004).

La teoría de la ocupación de los receptores, en la que se supone que una respuesta surge a partir de un receptor ocupado por un fármaco, se basa en la ley de acción de masas. La teoría fue propuesta por Clark (1930), quien es considerado el primero en aplicar el análisis matemático a las nociones sobre la acción de los medicamentos. El primer paso en la acción de los fármacos sobre blancos específicos consiste en la formación de un complejo fármaco-blanco; en general, la unión es reversible y se representa mediante la ecuación:



donde F = molécula del fármaco, B = blanco o receptor libre, FB= complejo fármaco-blanco; mientras que k_1 y k_2 son las respectivas constantes de la velocidad de formación y desintegración del complejo.

A esta reacción se aplica la ley de acción de masas, la cual establece que la velocidad de una reacción química es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos; así, la velocidad a la cual se produce la reacción de formación depende de la concentración del fármaco [F] y de la concentración del blanco [B]:

$$\text{Velocidad de formación} = k_1 [F][B]$$

La velocidad a la cual se produce la reacción de disociación depende principalmente de la interacción entre el fármaco y el blanco [FB]:

$$\text{Velocidad de disociación} = k_2 [FB]$$

En el equilibrio, las velocidades de formación y de disociación son iguales:

$$k_1 [F][B] = k_2 [FB]$$

Por lo que la constante de disociación en el equilibrio (K_D) es definida por la relación entre las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_2/k_1).

$$\frac{[F][B]}{[FB]} = \frac{k_2}{k_1} = K_D$$

Cuando la mitad de los receptores están unidos al fármaco, es decir, cuando $[B] = [FB]$, la constante $K_D = [F]$. La K_D es una característica del fármaco y del blanco; se expresa en unidades de concentración y equivale numéricamente a la concentración de fármaco necesaria para ocupar el 50% de los sitios en condiciones de equilibrio. El inverso de la constante de disociación en equilibrio es la constante de afinidad K_A ($K_A = 1/ K_D$), por tanto, cuanto menor sea la K_D mayor será la afinidad del fármaco por unirse a su blanco: una afinidad alta significa una K_D pequeña. Valores de K_D del

orden nanomolar representan a fármacos con una alta afinidad por su blanco; dichos valores deben corresponder con los rangos de concentración alcanzados por ese fármaco en los tejidos (Dawson, 2003; Flórez et al., 2003; Rang et al., 2004).

Entre los ensayos que han sido desarrollados para poder evaluar y comparar las interacciones ligando-blanco *in vitro* se encuentra el método llamado de unión con radioligandos o “binding”. Los métodos desarrollados para el estudio de estas interacciones tienen como finalidad fundamental el obtener una cuantificación de la afinidad presentada entre las moléculas de interés. Por ejemplo, utilizando este ensayo se realizan estudios de saturación, en donde la cantidad de radioligando requerida para saturar los receptores es medida y analizada para determinar la K_D y el número total de receptores expresados en las células (B_{max}). También se utiliza para realizar experimentos de unión competitiva, en donde un ligando de interés compite por sitios del receptor disponibles con un radioligando estándar de afinidad conocida; los datos obtenidos son analizados para obtener otro indicador de afinidad, la llamada IC_{50} , que corresponde a la concentración de ligando de interés requerida para reducir la unión específica del radioligando en un 50%. Otra medida de afinidad comúnmente encontrada en la literatura es la K_i , la constante de disociación en equilibrio del competidor, también llamada constante de inhibición; ésta se calcula mediante la ecuación de Cheng-Prusoff que relaciona la K_i con la IC_{50} del competidor en términos de la concentración y la K_D del radioligando (Bigott-Hennkens et al., 2008):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[F]}{K_D}}$$

Aunque la mayoría de los fármacos exhiben una acción relativamente selectiva sobre un tipo de receptor, actualmente se piensa que ningún fármaco es verdaderamente específico (Dawson, 2003). En los últimos años, se ha observado que los fármacos a menudo se unen a más de un blanco molecular, lo que sugiere que la analogía “escopeta mágica” sería más correcta que la metáfora de sustancias que actúan como “balas mágicas” uniéndose selectivamente a blancos fisiológicos específicos, enunciada por Ehrlich (Hopkins, 2009).

indirectamente, con base en una respuesta fisiológica o señal bioquímica dentro de la célula (Lomenick et al., 2009).

Los métodos clásicos basados en la afinidad incluyen a la cromatografía de afinidad, en la que se inmoviliza el ligando de interés en un soporte sólido, y los métodos de unión de radioligandos descritos anteriormente, donde no se necesita una matriz y se basan en la incorporación de un radioisótopo fotorreactivo o marca fluorescente en la molécula farmacológica de interés. Las limitantes más importantes de los actuales métodos basados en la afinidad son: a) la necesidad de modificar cada droga individualmente sin perder su bioactividad y b) no poder analizar interacciones fármaco-receptor en una mezcla compleja de proteínas, lo que limita a probar una proteína o receptor, en forma relativamente pura por cada ensayo (Lomenick et al., 2009).

La importancia de la identificación de blancos moleculares radica en el hecho de que existe un gran número de fármacos que son actualmente utilizados en la clínica, de los que se sospecha que también tienen afinidad por blancos moleculares distintos a los reportados en un principio. Uno de ellos es el que utilizamos en el presente proyecto como droga “sonda”: la fluoxetina. En la siguiente sección describiré brevemente lo que se sabe sobre este fármaco, debido a la importancia que tiene su uso en la presente investigación.

2.4 La fluoxetina

La fluoxetina (3-(*p*-trifluorometilfenoxi)-*N*-metil-3-fenilpropilamina) (Figura 2) fue descrita en 1974 como un inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT. Después de las publicaciones iniciales, tomó más de 16 años completar el desarrollo de hidrocloreuro de fluoxetina (Prozac), que culminó en su aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) en 1987 (Wong et al., 2005). La FDA aprobó el uso de la fluoxetina para el tratamiento de los siguientes trastornos psiquiátricos: bulimia nerviosa, trastorno obsesivo-compulsivo y depresión (Salazar et al., 2010).

Prozac fue el primer miembro de una nueva clase de fármacos antidepresivos: los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (ISRS). Prozac regula el estado de ánimo incrementando los niveles de 5-HT en la sinapsis neuronal. Existe evidencia clara de que la 5-HT, además de jugar un papel significativo en la neurotransmisión y la depresión, podría también constituir un factor que interviene en el desarrollo de otros trastornos tales como la obesidad y la anorexia (Wong et al., 2005).

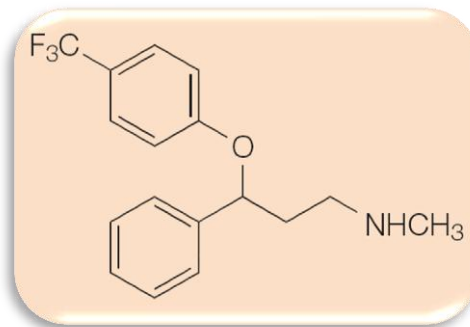


Figura 2. Estructura química de la fluoxetina.

La fluoxetina se absorbe tras su administración oral con una biodisponibilidad del 72%. En voluntarios sanos, las concentraciones plasmáticas máximas (15-55 µg/l) se alcanzan después de 6-8 horas de una dosis oral única de 30-40 mg. Tras un metabolismo hepático (desmetilación), se transforma en su metabolito principal, la norfluoxetina (desmetilfluoxetina), que posee tanta actividad como la propia fluoxetina. *In vitro* se une a proteínas plasmáticas en un 95% y se distribuye ampliamente por todo el organismo (Salazar et al., 2010).

La mayoría de los estudios realizados con fluoxetina para valorar su perfil de efectos secundarios se llevaron a cabo en pacientes que sufrían depresión. En comparación con el placebo, los efectos adversos más frecuentes durante el primer mes de tratamiento con fluoxetina son náuseas, insomnio, cefalea, nerviosismo, somnolencia, ansiedad, anorexia, diarrea, sequedad de boca, temblor, rinitis, mareo, sudación y astenia. Otros efectos adversos descritos con menor frecuencia (<1%) son: euforia, discinesia, acatisia, sangrado espontáneo, reacciones paranoides con alucinaciones y bradicardia. En el 4% de los pacientes aparece algún tipo de erupción cutánea. La fluoxetina se asocia también a la disminución de la concentración de glucosa y exige precaución en pacientes diabéticos en tratamiento

con hipoglucemiantes. Las mujeres han notificado pérdida de libido o alteraciones orgásmicas durante el tratamiento, y los varones, pérdida de libido, anorgasmia, dificultad de erección y retraso de eyaculación; la frecuencia de dichos efectos es variable pudiendo aparecer entre el 20 y el 75% de los pacientes tratados (Salazar et al., 2010; PLM 2006; Rang et al., 2004).

La introducción de Prozac alteró de manera notable al mercado de los antidepresivos, así como el tratamiento de la depresión. No pasó mucho tiempo para que los ISRS alcanzaran una amplia aceptación en el tratamiento de la depresión (Wong et al., 2005). Actualmente, la fluoxetina es el antidepresivo más prescrito en los Estados Unidos y se utiliza habitualmente en muchos otros países (Salazar et al., 2010).

2.5 La depresión y el sistema monoaminérgico

La depresión es una enfermedad psiquiátrica extraordinariamente frecuente para la que se han propuesto varias teorías neuroquímicas y en cuyo tratamiento se utilizan una gran variedad de fármacos. Éste es el más frecuente de los trastornos afectivos (del estado de ánimo); puede oscilar entre un cuadro muy leve que bordea la normalidad y la depresión grave (psicótica), acompañada de alucinaciones e ideas delirantes. La depresión es una causa importante de discapacidad y muerte prematura en todo el mundo; una persona que padece depresión corre un riesgo considerable de morir por suicidio. Los síntomas principales abarcan componentes emocionales y biológicos: sentimiento de desdicha, apatía, pesimismo, baja autoestima, culpa, indecisión, pérdida de motivación, pensamiento y acción lentos, pérdida de la libido, trastornos del sueño y pérdida de apetito (Rang et al., 2004; Carlson, 1999).

La principal teoría bioquímica acerca de la depresión es la hipótesis monoaminérgica, propuesta por Schildkraut en 1965, según la cual, la depresión se debe a una disminución y deficiencia funcional de los neurotransmisores monoaminérgicos 5-HT, DA y norepinefrina (NE) (Siegel et al., 2006) en determinadas regiones del encéfalo (Rang et al., 2004).

En la Figura 3 se muestra el esquema de una sinapsis monoaminérgica. La 5-HT, la DA y la NE son almacenadas en vesículas en la terminal presináptica. La translocación del neurotransmisor al interior de la vesícula es mediada por transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs). En los tres sistemas, los neurotransmisores son liberados al espacio sináptico y ejercen su acción activando receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), con la excepción del receptor 5-HT₃ que es un canal iónico dependiente de ligando (LGIC). La duración de las acciones de 5-HT, NE y DA está en parte determinada por la velocidad de recaptura del neurotransmisor al interior de la neurona por los transportadores de monoaminas, para posteriormente ser de nuevo almacenado dentro de las vesículas por medio de los VMATs e iniciar nuevamente el ciclo (Andersen et al., 2009).

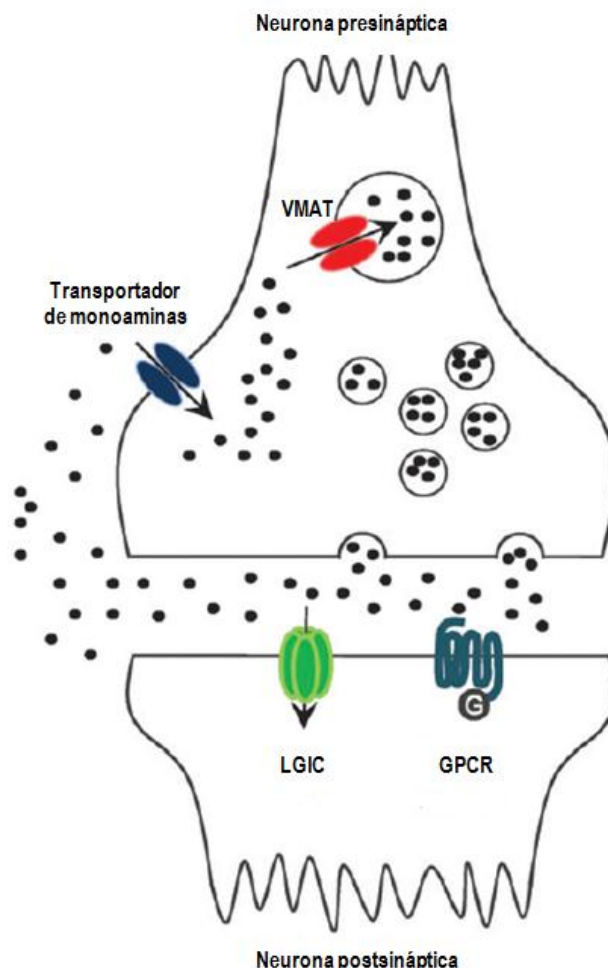


Figura 3. Representación esquemática de una sinapsis monoaminérgica simplificada. VMAT: transportador vesicular de monoaminas; GPCR: receptor acoplado a proteínas G; LGIC: canal iónico activado por ligando. Modificado de Andersen et al., 2009.

2.6 Transportadores de monoaminas: el SERT

El transportador de NE (NET), el transportador de DA (DAT) y el SERT constituyen el grupo de transportadores de monoaminas. La función neurofisiológica de dichos transportadores es regular las concentraciones extracelulares de 5-HT, NE y DA en el cerebro, recapturando a los neurotransmisores liberados desde el espacio extracelular hacia el interior de las células.

Los transportadores de monoaminas son proteínas localizadas en la membrana plasmática que utilizan el gradiente electroquímico de Na^+ para co-transportar al neurotransmisor. Pertenecen a la familia de acarreadores de soluto tipo 6 (SLC6), también conocida como familia de transportadores/ Na^+ simporte (Andersen et al., 2009).

Los transportadores de monoaminas, SERT, NET y, en menor grado, DAT, son blancos importantes de una amplia gama de fármacos usados en el tratamiento de la depresión, la ansiedad y desórdenes del comportamiento. La restauración de las deficiencias monoaminérgicas de 5-HT y NE a los niveles normales como estrategia terapéutica está basada en la hipótesis monoaminérgica de la depresión. Los antidepresivos más antiguos, los inhibidores de la monoamino oxidasa, incrementan los niveles sinápticos de neurotransmisores porque inhiben a la enzima que los degrada. Los antidepresivos tricíclicos, así como los ISRS y los inhibidores de la recaptura de NE, incrementan los niveles de 5-HT y/o NE por inhibición de la recaptura vía el SERT (tricíclicos y ISRS) o mediante el NET (tricíclicos e inhibidores de la recaptura de NE) (White et al., 2005).

El SERT humano es una proteína de 12 segmentos transmembranales, formada por 630 aminoácidos con peso aproximado de 73 kilodaltones. Su actividad es dependiente de Na^+ extracelular. Específicamente, co-transloca un ión de Na^+ con una molécula de 5-HT por ciclo de transporte, de manera que ese Na^+ actúa como co-sustrato del SERT. El gradiente electroquímico favorable del Na^+ es la fuente energética para el transporte de 5-HT que permite al SERT transportarla en contra de su gradiente químico, por lo que un factor limitante es el funcionamiento de la bomba Na^+/K^+ . La Figura 4 muestra la topología del transportador y los sitios

importantes que se han propuesto en el reconocimiento de sus ligandos (Andersen et al., 2009).

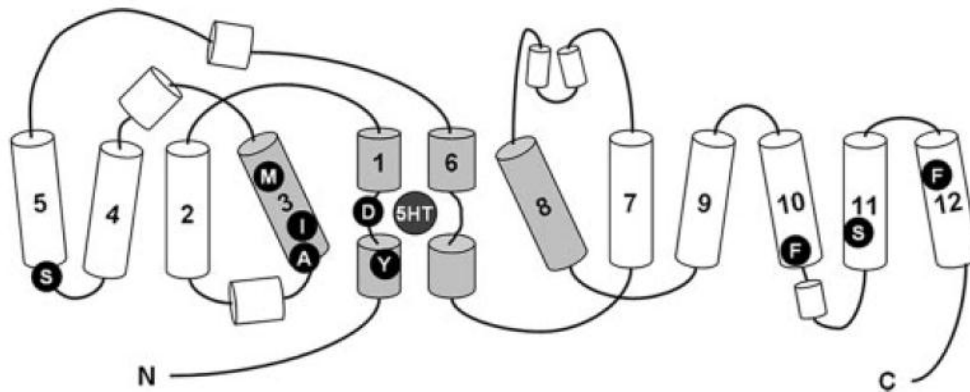


Figura 4. Topología del SERT. El sitio de unión a 5-HT está formado por residuos posicionados en TM1, TM3, TM6 y TM8 (mostrados en gris). Los residuos dilucidados como críticos en el reconocimiento de los fármacos ISRS y los antidepresivos tricíclicos están indicados como sigue: Y, Tyr-95; D, Asp-98; 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).

2.7 La fluoxetina y sus blancos moleculares

Dado que la fluoxetina es una de las moléculas que usamos en este estudio, es pertinente hacer un breve recuento de lo que se sabe de la unión de esta droga a diferentes blancos en distintos sistemas. La idea clásica generalmente aceptada, es que la fluoxetina ejerce sus efectos importantes por inhibición de la recaptura de 5-HT en las neuronas, lo que genera el consiguiente incremento de la concentración extracelular de dicho neurotransmisor. Tatsumi y colaboradores (1997) reportan una K_D de 0.81 nM sobre SERT, sin embargo, existen diversos estudios que reportan interacciones de este fármaco con otros blancos moleculares.

Por ejemplo, Ni y Miledi (1997) reportaron que la fluoxetina es un antagonista de receptores 5-HT_{2C}, pues inhibe la corriente iónica inducida por 5-HT en ovocitos de rana *Xenopus laevis* que expresan de manera heteróloga receptores 5-HT_{2C} de la corteza cerebral de rata.

También existe evidencia de que receptores colinérgicos nicotínicos (musculares y neuronales) pueden ser bloqueados por fluoxetina, pues el fármaco inhibe las corrientes de membrana producidas por la activación de dichos receptores cuando estos son expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante la microinyección del cRNA (complementary RNA) (García-Colunga et al., 1997).

La fluoxetina posee cierta actividad anticonvulsiva, en contraste con el efecto proconvulsivante de muchos otros antidepresivos. En un estudio realizado en células L929 (fibroblastos murinos) y HEK-293T (de riñón embrionario humano) transfectadas, se reportó un incremento en la actividad del receptor GABA_A por acción de la fluoxetina; esto sugirió que la fluoxetina actúa sobre un sitio modulador en este receptor (Robinson et al., 2003).

De igual manera, se ha reportado que los receptores a glutamato NMDA están relacionados con la patofisiología de la depresión y con el mecanismo de acción de los antidepresivos. Szasz et al. (2007), mediante técnicas electrofisiológicas y utilizando cultivos celulares de neuronas corticales de rata, demostraron que la fluoxetina tiene un efecto inhibitorio directo sobre receptores NMDA.

En lo que al sistema glicinérgico se refiere, se han analizado los efectos de la fluoxetina sobre la actividad de los receptores a glicina; se encontró que tanto ésta como su metabolito norfluoxetina inhiben las corrientes inducidas por glicina en cultivos de neuronas de hipocampo de rata (Ye et al., 2008).

De manera adicional, se cuenta con evidencia de que la fluoxetina puede bloquear directamente canales iónicos tanto de K⁺ como de Na⁺ y de Ca⁺⁺ (Tytgat et al., 1997; Kobayashi et al., 2003; Kennard et al., 2005; Pancrazio et al., 1998; Park et al., 1999; Traboulsie et al., 2006).

Recientemente, Keiser et al. (2009), mediante su método computacional SEA, predijeron la unión del Prozac al receptor adrenérgico β₁. El ensayo de unión por competencia con el radioligando [¹²⁵I]Pindolol mostró que la fluoxetina posee una K_i de 4.4 μM.

Sin embargo, los reportes publicados hasta ahora han sido realizados utilizando una gran diversidad de preparaciones y diferentes estrategias experimentales, además de haberse realizado en diferentes condiciones. Esta variabilidad imposibilita comparar los efectos múltiples que tiene la fluoxetina y tratar de reconocer los más importantes.

En un estudio electrofisiológico realizado previamente en nuestro laboratorio, se analizó el efecto de la fluoxetina sobre la función de proteínas de membrana del sistema nervioso central de la rata, expresadas exógenamente en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante la inyección del mRNA purificado del cerebro de mamíferos (Morales-Toxqui, 2011). Esta aproximación experimental tiene la ventaja de que es posible estudiar los efectos de un fármaco sobre diferentes proteínas de membrana, expresadas en un mismo ambiente celular y bajo las mismas condiciones fisiológicas. Los resultados de dicho estudio muestran que la fluoxetina tiene un efecto modulador sobre la función de varias proteínas: bloquea receptores serotoninérgicos y colinérgicos; modula receptores de GABA; inhibe a los receptores NMDA y kainato, así como las corrientes acarreadas a través de canales de Ca^{++} (Morales-Toxqui, 2011).

Los resultados obtenidos por Morales-Toxqui (2011) apoyan la propuesta central de este proyecto, en el cual pretendemos realizar la búsqueda de blancos moleculares de la fluoxetina mediante un marcaje de afinidad, utilizando membranas de ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan proteínas del sistema nervioso central.

Además de la fluoxetina, en este trabajo se utilizó la escopolamina como droga “sonda” que aportara información importante para el método que pretendemos implementar. En las siguientes líneas se presenta una breve descripción de esta droga y las razones por las cuales se eligió la escopolamina para continuar con la validación de la metodología anteriormente mencionada.

2.8 La escopolamina

Desde tiempos antiguos la gente sabía que ciertos extractos de plantas como la belladona (*Atropa belladonna*), la burladora (*Datura stramonium*) y otras de la familia Solanaceae, podían influir sobre el estado mental del individuo. Mucho tiempo después se descubrió que estas plantas contenían altas concentraciones de alcaloides tropánicos, como atropina y escopolamina (Figura 5). Estos alcaloides son los ingredientes activos responsables de inducir varios cambios conductuales y cognitivos (Klinkenberg y Blokland, 2010); ambos son compuestos de amonio terciario bastante liposolubles que se absorben fácilmente en el intestino o el saco conjuntival y atraviesan la barrera hematoencefálica (Rang et al., 2004).

La escopolamina, también llamada hioscina o por su nombre popular “burundanga”, es un alcaloide con varias aplicaciones médicas (Gryniewicz y Gadzikowska, 2008). Se utiliza en la clínica principalmente para inhibir los efectos de la activación parasimpática; así, se ha utilizado para tratar la bradicardia, la cinetosis y como complemento en anestesia (reducción de secreciones, broncodilatación) (Rang et al., 2004). La escopolamina es utilizada también para obtener un modelo farmacológico de “amnesia colinérgica” y ha sido usada tradicionalmente en el campo de la neuropsicofarmacología como una droga estándar (Ebert y Kirch, 1998).

La escopolamina y la atropina son antagonistas competitivos no selectivos de receptores de acetilcolina (ACh) muscarínicos. Estos receptores participan en el control de varias funciones fisiológicas en el sistema nervioso central, tales como el control de la actividad locomotora extrapiramidal, y procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Oki et al., 2005; Klinkenberg y Blokland, 2010).

Los cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) son proteínas de membrana de siete segmentos transmembranales, que pertenecen a la superfamilia de GPCRs. Los receptores M1, M3 y M5 se acoplan preferentemente a proteínas G de tipo G_q/G_{11} que activa a la fosfolipasa C, mientras que el M2 y el M4 se acoplan preferencialmente a proteínas G de tipo G_i y G_o que inhiben a la adenilato ciclasa (Oki et al., 2005; Hulme et al., 2003).

El derivado sintético de la escopolamina, N-metilescopolamina tritiada ($[^3\text{H}]\text{-NMS}$), se ha utilizado ampliamente para estudiar características de unión de los receptores colinérgicos muscarínicos (Schmeller et al., 1995). Las K_D calculadas a partir de experimentos de “binding” con $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ son alrededor de 1 nM y muestran una ligera diferencia en afinidad entre los subtipos de receptores: $M4 > M1 > M3 > M2$ (Oki et al., 2005; Klinkenberg y Blokland, 2010).

En el presente estudio se utilizó la escopolamina la cual se une específicamente a receptores M1. Los receptores M1 se localizan fundamentalmente en el sistema nervioso central, en neuronas periféricas y en las células parietales gástricas. Intervienen en efectos excitadores, como la excitación muscarínica lenta mediada por ACh en los ganglios simpáticos y las neuronas centrales. Los receptores M1 potencian también la secreción gástrica tras la estimulación vagal (Rang et al., 2004).

La información farmacológica previa que se tiene acerca de la escopolamina, el hecho de que sea una molécula específica con alta afinidad por el receptor M1, su capacidad de formar enlaces químicos cruzados con otras moléculas y los costos accesibles que tiene en el mercado, son las causas por las cuales se eligió a la escopolamina como droga “sonda” alternativa para tratar de implementar el método de identificación de blancos moleculares utilizando ovocitos de *Xenopus laevis*.

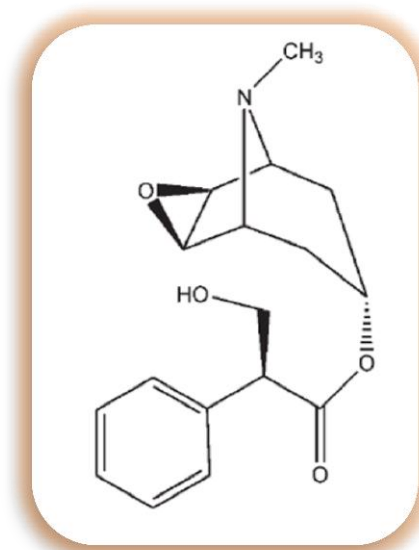


Figura 5. Estructura química de la escopolamina (Gryniewicz y Gadzikowska, 2008).

2.9 Nuevos métodos de identificación de blancos moleculares

El desarrollo de nuevos métodos para la identificación de blancos moleculares es un área que ha despertado gran interés en los últimos años. Por esta razón, se han desarrollado métodos innovadores con enfoques tanto experimentales como computacionales (Hopkins, 2009).

Por ejemplo, Lomenick et al. (2009) desarrollaron el método DARTS (por las siglas en inglés para “Drug Affinity Responsive Target Stability”), que toma ventaja de la reducción en la susceptibilidad a las proteasas que presentan las proteínas al unirse a su fármaco. Los autores proponen que la unión del fármaco estabiliza la proteína blanco, ya sea global o localmente, por ejemplo, proporcionando una conformación específica que la protege o enmascarando los sitios de reconocimiento de las proteasas. Este grupo de investigadores realizaron una serie de experimentos de distinta naturaleza para probar este método.

Como una prueba del principio conceptual en el que se basa su método, estos investigadores examinaron a la inmunofilina FKBP12, que es blanco en concentraciones nanomolares de las drogas inmunosupresoras rapamicina y FK506. La proteólisis de FKBP12, producida por la proteasa subtilisina, fue claramente disminuida por la presencia de la rapamicina o la FK506. La protección fue selectiva; por ejemplo, la incubación con wortmanina, una droga que no se une a FKBP12, no previno la proteólisis. Para demostrar el uso de DARTS como una herramienta aplicable a mezclas complejas de proteínas, aplicaron el método usando células humanas Jurkat tratadas con didemnina B (DB), un producto natural marino anticancerígeno que se une a EF-1 α , una proteína muy abundante previamente caracterizada en estas células. Los resultados revelaron que DB protege a EF-1 α de la proteólisis en muestras de lisado celular. La banda “protegida” que aparece en el gel fue analizada por espectrometría de masas, confirmando que EF-1 α fue la proteína mayoritaria presente en la muestra tratada con DB (Lomenick et al., 2009).

La principal ventaja del método DARTS es que no requiere de ligandos marcados y, por lo tanto, usa la molécula nativa; es decir, no está limitado a cambios químicos en la molécula y puede ser potencialmente usado con cualquier fármaco. Por otro lado,

la afinidad de la droga a su blanco es un factor limitante; los resultados sugieren que DARTS funciona para moléculas con afinidades por arriba del orden de micromolar. Además la limitante fundamental del método es que la susceptibilidad de las proteínas a la proteólisis está determinada por su energía conformacional y se ha demostrado que hay un pequeño número de proteínas seleccionadas evolutivamente que son lo suficientemente resistentes a la digestión de las proteasas.

Actualmente, también se están desarrollando métodos *in silico* para predecir perfiles farmacológicos. El más conocido de estos es el de acoplar/ensamblar virtualmente la estructura tridimensional de un compuesto en la estructura de una proteína. Entre las limitaciones de estos métodos está la necesidad de contar con estructuras de alta resolución de difracción de rayos X de las proteínas. Esto es particularmente difícil de obtener para proteínas de membrana, que representan más del 60% de los blancos moleculares. Enfoques alternativos a este no requieren la estructura de la proteína, sino que trabajan analizando similitudes químicas y fenotípicas entre moléculas para identificar éstas con sus blancos (Hopkins, 2009).

En otro método desarrollado recientemente, Keiser et al. (2009) implementaron una técnica llamada SEA (por las siglas en inglés para “Similarity Ensemble Approach”) para comparar más de 3600 fármacos contra cientos de blancos. SEA es una técnica quimioinformática que compara fármacos contra blancos por la similitud de los ligandos que se unen a ellos, expresada como un “valor de expectación” adaptando el algoritmo de BLAST. Las 3665 drogas fueron comparadas contra 65241 ligandos organizados en 246 blancos tomados de la base de datos MDL Drug Data Report. De 901590 comparaciones, 6928 fueron similares y se analizaron tanto retrospectivamente (búsqueda en literatura y otras bases de datos) como experimentalmente: se estudiaron 30 predicciones experimentalmente accesibles mediante ensayos de unión con radioligandos. En total, 23 nuevas interacciones fármaco-blanco fueron confirmadas, cinco de las cuales resultaron ser de una alta afinidad ($K_i < 100$ nM).

Aún cuando las técnicas computacionales para el descubrimiento de fármacos y blancos existen desde hace algunos años y la disponibilidad de bases de datos con

información farmacológica es lo suficientemente grande para aplicar los métodos, existe a menudo desconfianza en su uso, debido a que todavía proporciona un número significativo de falsos positivos (Hopkins, 2009).

2.10 Búsqueda de interacciones ligando-blanco utilizando ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* son células gigantes con un diámetro aproximado de 1.2-1.4 mm, que son producidas durante todo el año y se pueden obtener en grandes cantidades, características que las hacen ideales para la experimentación. Los ovocitos han sido utilizados como modelo en una gran variedad de estudios fisiológicos: embriogénesis, división celular, interacciones célula-célula, así como en el estudio de la estructura y función de canales iónicos y receptores de membrana que pueden ser expresados en la membrana del ovocito por microinyección de mRNA o cDNA (complementary Deoxyribonucleic Acid) (Arellano et al., 1996).

John Gurdon demostró por primera vez en 1971 que la inyección de mRNA de mamífero en el ovocito de *Xenopus laevis* era correctamente utilizado por la maquinaria de síntesis proteica de éste, de tal forma que cantidades importantes de la proteína codificada podían ser expresadas por varios días en el citoplasma celular del ovocito; más tarde se demostró la expresión heteróloga de receptores, canales iónicos y otras proteínas de membrana del sistema nervioso de mamíferos (Miledi et al., 1989).

Los avances de la biología molecular en la clonación de receptores y canales iónicos impulsó el uso del ovocito como uno de los modelos más utilizados para el estudio de las propiedades funcionales y farmacológicas de un gran número de proteínas. Desde hace varios años este modelo ha sido utilizado para el estudio funcional de proteínas de membrana mediante la inyección citoplasmática de mRNA; un par de días después de la inyección, las proteínas recién sintetizadas son incorporadas de forma correcta en la membrana y permiten ser estudiadas utilizando distintos métodos: electrofisiológicos, bioquímicos o de microscopía de fluorescencia. Las

ventajas experimentales que presenta el ovocito como sistema de expresión heteróloga y la gran cantidad de información que se posee del mismo, hace suponer que su uso racional en la búsqueda de blancos moleculares podría representar una herramienta exitosa comparada con las que se han desarrollado hasta ahora. En este trabajo iniciamos el desarrollo de un nuevo método, BILBOX, el cual utiliza el ovocito de *Xenopus laevis* como modelo de expresión heteróloga de proteínas para la búsqueda de interacciones ligando-blanco.

3. JUSTIFICACIÓN

Una vez que en nuestro grupo de trabajo se demostró que las moléculas del sistema nervioso central de rata, expresadas en la membrana del ovocito, muestran interacciones con fluoxetina semejantes a las observadas en otros modelos, el objetivo fue ampliar esta búsqueda, utilizando herramientas bioquímicas (marcaje de afinidad, autorradiografía y espectrometría de masas), lo que comprobaría las interacciones reportadas y, además, mostraría qué otras moléculas podrían interactuar con la droga. La necesidad de extender esta búsqueda radica en el hecho de que el análisis funcional está restringido a solo una muestra de las moléculas membranales que pueden estar siendo expresadas a través de la inyección del mRNA, por lo que métodos globales permitirían analizar un mayor número de interacciones, para la posterior identificación de los blancos y su estudio funcional dirigido.

De acuerdo a los antecedentes que se tienen sobre la interacción farmacológica de la fluoxetina con distintos blancos moleculares y la necesidad de implementar un método sistemático que nos permita tamizar de forma confiable y rápida un gran número de posibles proteínas blanco, se planteó este proyecto con la finalidad de aportar información para la estandarización de dicho método y, posteriormente, definir los posibles blancos moleculares de la fluoxetina sobre proteínas de membrana del sistema nervioso central. Así, se emplearon en este estudio dos fármacos que fueron utilizados como “sondas” para reconocer sus blancos expresados en la membrana del ovocito: la fluoxetina y la escopolamina. Como ya he comentado, el primero es un fármaco exitoso que tiene diversos efectos

secundarios, probablemente por su unión a diversos blancos moleculares, mientras que el segundo corresponde a una sustancia con una afinidad alta por receptores muscarínicos tipo M1, por lo que sus asociaciones con otras moléculas sería menor, además de aumentar las posibilidades de marcado en un sistema de sobreexpresión de su receptor.

4. HIPÓTESIS

La fluoxetina y la escopolamina pueden interaccionar con blancos moleculares del sistema nervioso central expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, los cuales pueden ser reconocidos por marcaje de afinidad y métodos de identificación de proteínas.

5. OBJETIVOS

GENERAL:

Implementar un sistema bioquímico para reconocer las interacciones de la fluoxetina y la escopolamina con moléculas blanco del sistema nervioso, expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, mediante un marcaje de afinidad en membranas aisladas de ovocitos inyectados con cRNA.

PARTICULARES:

- Estandarizar la obtención de membranas de ovocitos de *Xenopus laevis* utilizando ovocitos no inyectados e inyectados con el cRNA de proteínas conocidas y utilizadas como marcadores: e.g., el receptor P2X4 fusionado a la proteína verde fluorescente (P2X4-GFP).
- Estandarizar el marcaje de afinidad con las drogas específicas tritadas fluoxetina y escopolamina, utilizando proteínas de membrana provenientes de ovocitos no inyectados e inyectados con el cRNA del SERT y del receptor M1.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención y microinyección de ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos fueron obtenidos de ranas *Xenopus laevis*. La rana fue anestesiada por hipotermia, colocándola en hielo por 30 minutos mínimo o hasta observar ausencia de reflejos. Una vez anestesiada, fue colocada en una cama de hielo y sometida a una cirugía que consiste en hacer una incisión en la zona baja del abdomen para disecar de dos a tres lóbulos ováricos; éstos fueron colocados en una caja Petri con solución Barth normal, conteniendo: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 5 mM Hepes y 70 µg/ml de gentamicina (pH de 7.4). Posteriormente la rana fue suturada y colocada en agua a temperatura ambiente para su recuperación.

Los ovocitos en estadios V-VI fueron separados de los lóbulos ováricos y tratados con una solución de colagenasa (0.4 mg/ml) en Ringer normal (115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5 M Hepes, ajustada a pH 7 con NaOH 5 N) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del tratamiento enzimático los ovocitos fueron lavados 2 veces con solución Ringer normal y 2 veces con Barth normal, se incubaron 12 horas a 19 °C y posteriormente se removió la capa folicular con la ayuda de pinzas de disección. Los ovocitos fueron incubados por 12 h más y después seleccionados para su microinyección con 50 nl de una solución de cRNA (concentración aproximada de 1 µg/µl). Finalmente, los ovocitos fueron incubados en solución Barth a 19 °C durante 3 días para la expresión de las proteínas.

6.2 Síntesis de cRNA de P2X4-GFP, SERT y M1

Los cRNAs se obtuvieron por transcripción *in vitro*, utilizando como moldes los cDNAs correspondientes, clonados en el vector pXEN. La reacción de transcripción se realizó con el estuche comercial mMessage mMACHINE (Ambion), de acuerdo al protocolo del fabricante. En resumen, se utilizaron 2 µg de DNA, los cuales se mezclaron con los NTP/CAP (ATP, CTP, UTP, GTP y análogo de cap) y la enzima RNA polimerasa en un volumen total de 20 µl. La mezcla se incubó 2 h a 37 °C.

Posteriormente, la reacción se detuvo por la adición de 115 μl de agua y 15 μl de solución de acetato de amonio. Después el cRNA fue purificado por una extracción fenol-cloroformo; con este fin se adicionaron 150 μl de fenol-cloroformo 1:1; se centrifugó a 15500 g durante 4 min y se tomó la fase acuosa que contenía el cRNA. Para precipitar el cRNA se adicionaron 150 μl de isopropanol, se mezcló vigorosamente y se dejó 12 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente se centrifugó la muestra a 18000 g durante 20 min y por decantación se obtuvo un sedimento que se lavó con 750 μl de etanol 80%. Se resuspendió el cRNA en 20 μl de agua MQ estéril. El RNA fue cuantificado por espectrofotometría (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000) y analizado cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa.

6.3 Obtención de membranas de ovocitos de *Xenopus laevis*

Para realizar el marcaje de afinidad de las proteínas expresadas en el ovocito de *Xenopus* se decidió utilizar una preparación de membranas totales, con el fin de facilitar el análisis bioquímico y disminuir algunas complicaciones que implica utilizar el ovocito completo; este tipo de preparaciones se han utilizado extensivamente en la caracterización de receptores y otras proteínas de membrana, principalmente en ensayos de unión de radioligandos. En estas preparaciones las proteínas permanecen ensambladas en la membrana plasmática y conservan su estructura cuaternaria (Bigott-Hennkens et al., 2008).

Para esto se homogenizaron los ovocitos en una solución de homogenización (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 80 mM sacarosa e inhibidores de proteasas "Complete Mini" Roche; pH 7.6) utilizando 40 μl por ovocito, mediante un aparato tipo "Potter-Elvehjem" vidrio-teflón. Seguido de esto, por medio de centrifugación diferencial a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (23 g por 5 min; 1125 g por 10 min; 18000 g por 20 min) se obtuvo un sedimento de membranas, el cual se disolvió en 50 μl de solución de resuspensión (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl_2 , 0.1% BSA e inhibidores de proteasas; pH 7.6). La concentración de proteínas obtenidas en esta preparación fue determinada por el método de Bradford.

6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot

Para analizar las proteínas presentes en las preparaciones de membranas, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 y 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis es un método que separa moléculas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico; es un método rápido, fácilmente reproducible y económico, que se ha utilizado ampliamente para caracterizar proteínas (Bollag y Edelstein, 1991). Las proteínas se colocan en una solución que contiene un potente detergente cargado negativamente, el dodecil sulfato sódico (SDS). Puesto que este detergente se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas, haciendo que las cadenas polipeptídicas se desplieguen, las diferentes moléculas proteicas quedan liberadas de sus asociaciones con otras moléculas proteicas o lipídicas y se disuelven libremente en la solución del detergente. Como matriz inerte a través de la cual migran las proteínas, se utiliza un gel de poliacrilamida con numerosos puentes cruzados; cuando una mezcla de proteínas solubilizadas con SDS se somete a electroforesis a través de la lámina de gel de poliacrilamida cada molécula de proteína se une a una gran cantidad de moléculas del detergente, cargadas negativamente, que enmascaran la carga intrínseca de la proteína y hacen que cuando se aplica un voltaje la proteína migre hacia el electrodo positivo. Finalmente, tras su resolución en gel, las bandas proteicas se hallan ordenadas en función de su peso molecular, y se pueden detectar fácilmente tiñendo el gel con un colorante o realizando tinciones de plata (Alberts et al., 2008).

En este proyecto utilizamos el equipo Mini PROTEAN 3 System de BIO-RAD para preparar geles de 1 mm de grosor y realizar la electroforesis. Las muestras proteicas fueron disueltas en solución amortiguadora de Laemmli 2X (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 140 mM SDS, 20% glicerol, 2% 2-mercaptoetanol, 0.03 mM azul de bromofenol) y hervidas durante 5 min antes de ser cargadas en el gel.

Después de correr la electroforesis y con el fin de observar la integridad de las proteínas obtenidas, se realizó una tinción con plata; este método tiene un límite de detección de 2 ng de proteína y permite la visualización de proteínas con bajos niveles de expresión; esta tinción se realizó utilizando el estuche comercial Dodeca

Silver Stain Kit (BIO-RAD). Los geles teñidos fueron secados en un bastidor y fotografiados en un transiluminador de luz blanca.

Con el fin de saber si la preparación de membranas totales se encontraba enriquecida en membrana plasmática, un grupo de ovocitos fue inyectado con el cRNA de la quimera P2X4-GFP. P2X4 es un receptor canal que se expresa en la membrana plasmática y es activado por ATP extracelular; la fusión con la GFP permite su análisis utilizando microscopía de fluorescencia. En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se ha mostrado que esta proteína se expresa en la membrana y que es funcional.

La identificación de la proteína quimérica P2X4-GFP se realizó por Western blot en preparaciones de membranas provenientes de ovocitos previamente monitoreados por microscopía de fluorescencia y electrofisiología. El volumen necesario de la preparación de membranas, conteniendo 100 µg de proteína total, fue fraccionado por SDS-PAGE. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), las cuales se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente con una solución de leche al 5% en TBS-Tween20. Después las membranas fueron incubadas con anticuerpo contra P2X4 (Alomone labs.) o GFP (Sta. Cruz Biotechnology, Inc.) (1:1000) por 1 h a temperatura ambiente; posteriormente se lavaron con TBS-Tween20 y a continuación fueron incubadas con el anticuerpo secundario anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano HRP (1:10000, Zymed) por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las proteínas inmunorreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia (Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents) y autorradiografía.

6.5 Registro electrofisiológico por control de voltaje

Los registros electrofisiológicos de ovocitos fueron realizados por la técnica de control de voltaje con dos electrodos. El control de voltaje es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de las corrientes iónicas membranales.

La técnica controla el potencial de la membrana en el valor que el experimentador desee. Se mide el potencial de membrana con un microelectrodo colocado en el interior de la célula y se compara electrónicamente este voltaje con el voltaje a mantener llamado potencial de mantenimiento. A continuación, el circuito de control pasa una corriente de retroalimentación a la célula a través de otro electrodo intracelular. Este circuito electrónico mantiene el potencial de membrana en el nivel del potencial de mantenimiento, aun frente a cambios en la permeabilidad que normalmente alterarían el potencial. De esta manera el dispositivo permite la medición simultánea de la corriente necesaria para mantener la célula en el voltaje deseado. Por lo tanto, la técnica de control de voltaje permite cuantificar las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana (Hille, 1992).

El registro electrofisiológico de los ovocitos fue realizado dentro de un periodo de 3-5 días después de la inyección del cRNA. Los electrodos utilizados fueron elaborados con capilares de vidrio de borosilicato y llenados con solución 3 M de KCl. Regularmente, los ovocitos fueron controlados a un voltaje de -60 mV ó -100 mV y perfundidos constantemente con solución Ringer normal (10 ml/min) que contenía en mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, ajustada a pH 7.0 con NaOH; la corriente transmembranal fue monitoreada mientras el agonista 5-HT o ACh fue aplicado en la solución de perfusión en una concentración de 100 µM durante 40-60 segundos. Las respuestas expresadas fueron comparadas con las obtenidas de los ovocitos control no inyectados. En algunos experimentos se utilizó una solución donde el Na⁺ en la solución Ringer fue substituido equiosmolarmente por NMDG⁺, a esta solución le llamamos solución Ringer 0Na⁺.

6.6 Marcaje de fotoafinidad sobre SERT

Metodologías usadas en la química de proteínas como el “entrecruzamiento” y el “marcaje de fotoafinidad” en combinación con técnicas de espectrometría de masas pueden proveer información respecto a interacciones fármaco-proteína (Robinette et al., 2006).

La técnica de marcaje de fotoafinidad fue desarrollada e inicialmente descrita por Singh, Thornton y Westheimer desde 1962, pero los principios básicos siguen siendo los mismos. En ésta técnica, un ligando que posee un grupo fotoactivable por luz UV es incubado con su blanco para formar un complejo ligando-blanco mediante una unión no covalente; los ligandos se unen específicamente al blanco debido a su afinidad. La fotólisis resulta en la creación de intermediarios reactivos que forman enlaces covalentes con las proteínas receptoras. Tres tipos de sondas fotoactivables son usados para marcaje de afinidad: grupo azido (también llamado fenilazida), benzofenona y diazirinas. El complejo covalente estable permite el uso de herramientas analíticas rigurosas como la electroforesis y la espectrometría de masas para examinar la estructura del complejo (Robinette et al., 2006).

La autorradiografía con ligandos radiactivos ha sido útil en muchos estudios farmacológicos. El isótopo más empleado es el tritio ($[^3\text{H}]$), el cual tiene las ventajas de ser de bajo costo, fácil de manipular, de bajo riesgo y de tener una gran variedad de formas para introducir la marca en los ligandos (Frey y Albin, 2001).

La identificación o caracterización del sitio de unión de un ligando en una proteína es quizá la aplicación más común de las técnicas de marcaje de fotoafinidad acoplado a espectrometría de masas; pero también, muchos grupos han demostrado la posibilidad de combinar proteómica con marcaje de fotoafinidad para identificar blancos proteicos de fármacos candidatos (Robinette et al., 2006); así, el desarrollo de la ciencia farmacéutica puede ser asistido por estas tres importantes metodologías: el marcaje de afinidad, la autorradiografía y la espectrometría de masas (Frey y Albin, 2001).

El marcaje de fotoafinidad consistió en incubar 200 μg de proteínas contenidas en la preparación de membranas totales en un volumen total de 300 μl de una solución de fotoafinidad (FA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas "Complete Mini" Roche; pH 7.6), conteniendo 20 nM de fluoxetina tritiada ($[^3\text{H}]$ -F: Fluoxetine HCL, N-methyl- ^3H ; concentración 1 mCi/ml; actividad específica 80 Ci/mMol; ARC American Radiolabeled Chemicals, Inc). Con el fin de determinar la magnitud de la unión inespecífica se realizaron controles en los que la unión fue competida con el ligando no marcado (fluoxetina fría) (FF: Fluoxetine hydrochloride;

M.W. 345.79; TOCRIS); las muestras fueron preparadas como se muestra en la tabla siguiente:

	C1	C2	C3	S1	S2	S3
Proteína	200 µg	200 µg	200 µg	200 µg	200 µg	200 µg
FF	-	10 µM	100 µM	-	10 µM	100 µM
[³H]-F	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM

Tabla 1. Preparación de muestras para el marcaje de fotoafinidad con [³H]-F. Las muestras incluyen: C, membranas de ovocitos control, no inyectados; y S, membranas de ovocitos expresando SERT. La muestra 1 no fue competida, mientras que en 2 y 3 se compitió contra 10 y 100 µM de FF, respectivamente.

La incubación de los tubos se realizó por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a realizar el entrecruzamiento con luz UV (10 min; Hoefer UVC500/UV Crosslinker).

Debido a que el entrecruzamiento se realizó con la preparación de membranas en solución y en un volumen que es demasiado grande para su análisis posterior, las proteínas fueron concentradas por medio de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y desoxicolato de sodio (DOC), para esto se ajustó el volumen 1 ml con buffer de resuspensión; se agregaron 100 µl de DOC 15% y 50 µl de TCA 100%; la muestra fue incubada por 15 min en el congelador y posteriormente centrifugada a 9183 g durante 5 min. El sobrenadante fue desechado y el sedimento fue lavado para eliminar el ligando no incorporado, posteriormente fue resuspendido en 50 µl de una solución que contenía: NaOH 0.8 N, SDS 10% y Urea 0.5 g/ml (Bollag y Edelstein, 1991). Finalmente, se adicionó solución de Laemmli a las muestras para ser analizadas por SDS-PAGE.

6.7 Marcaje de afinidad sobre M1

El marcaje de afinidad del receptor muscarínico M1 con escopolamina tritiada ($[^3\text{H}]$ -NMS: Scopolamine Methyl Chloride N-methyl- ^3H ; concentración 1 mCi/ml; actividad específica 79 Ci/mMol; Perkin Elmer) fue realizado, en forma similar al marcaje con $[^3\text{H}]$ -F, con 200 μg de la muestra proteica en un volumen total de 300 μl pero de una solución de afinidad libre de aminos (SALA: HEPES 30 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas "Complete Mini" Roche; pH 7.6) conteniendo 100 nM de $[^3\text{H}]$ -NMS. También fue realizado un ensayo de competencia con 10 y 100 μM de atropina (ATR: Atropine; M.W. 289.4; SIGMA); las muestras fueron preparadas como se observa en la siguiente tabla:

	C1	C2	C3	M1.1	M1.2	M1.3
Proteína	200 μg	200 μg	200 μg	200 μg	200 μg	200 μg
ATR	-	10 μM	100 μM	-	10 μM	100 μM
$[^3\text{H}]$-NMS	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM

Tabla 2. Preparación de muestras para el marcaje de afinidad con $[^3\text{H}]$ -NMS. Las muestras incluyen: C, membranas de ovocitos control, no inyectados; y M1, membranas de ovocitos expresando el receptor M1. La muestra M1.1 no fue competida, mientras que M1.2 y M1.3 fueron competidas contra 10 y 100 μM de ATR, respectivamente.

Las muestras fueron incubadas 1 h a temperatura ambiente; en este caso el entrecruzamiento se realizó añadiendo a cada tubo 5 μl de una solución de glutaraldehído al 2.3 %. La reacción se mantuvo durante 5 min y posteriormente se añadieron 10 μl de Tris-HCl 1 M, pH 8 (Melcher y Chen, 2007). La precipitación de las proteínas se realizó con TCA y DOC, al igual que en el marcaje con $[^3\text{H}]$ -F, y se analizaron también por SDS-PAGE.

6.8 Fluorografía

Para la detección de muestras radiomarcadas con tritio fue necesario incrementar la sensibilidad de detección usando métodos fluorográficos (Bollag y Edelstein, 1991). Después de la electroforesis los geles se fijaron 30 min en solución desteñidora (40% v/v metanol, 7% v/v ácido acético y agua); fueron deshidratados con dimetilsulfóxido (DMSO) durante 30 min; e incubados 2 h en una solución de 2,5-difeniloxazol (PPO) en DMSO (20% w/w) para la impregnación del agente reforzador; y finalmente fueron lavados con agua por 1 h para la precipitación del PPO. Los geles fueron secados y expuestos ante una película (Amersham Hyperfilm GE Healthcare) (a -70 °C durante 5 ó 20 días) para el análisis por autorradiografía (Laskey y Mills, 1975).

6.9 Búsqueda de interacciones ligando-blanco en ovocitos de *Xenopus laevis*

La Figura 6 muestra el diagrama de flujo general para la identificación de blancos moleculares del sistema nervioso central en membranas aisladas de ovocitos de *Xenopus laevis*. El método propone la utilización de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con mRNA de cerebro de rata; después de 3-5 días los ovocitos expresan en su membrana una amplia gama de proteínas.

En este trabajo nos enfocamos en la estandarización de la segunda parte del método, esto es, la obtención de las membranas y el marcaje de fotoafinidad. Una vez comprobada la expresión de las proteínas, las membranas purificadas del ovocito fueron sometidas a un marcaje de afinidad con el fármaco en estudio y, después del entrecruzamiento, las muestras fueron separadas por SDS-PAGE para finalmente buscar la señal radiactiva por autorradiografía.

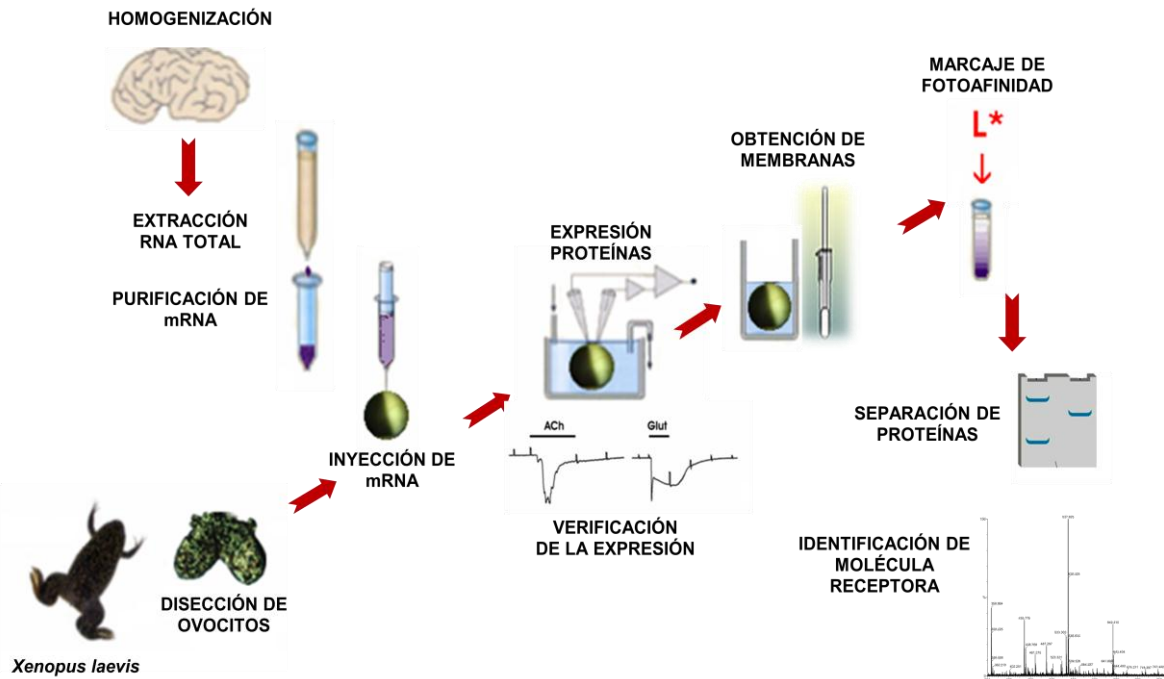


Figura 6. Procedimiento general para la búsqueda de proteínas blanco de ligandos marcados radiactivamente, utilizando el sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con mRNA de cerebro de mamífero.

7. RESULTADOS

7.1 Estandarización de la obtención de membranas de ovocitos de *Xenopus laevis* utilizando ovocitos no inyectados e inyectados

Como un primer paso en la implementación del método propuesto, adecuamos las metodologías conocidas para aplicar las mejores condiciones que nos permitieran la obtención eficiente de las membranas de los ovocitos, de tal forma que pudiéramos contar con una muestra rica en proteínas de membrana expresadas en este sistema.

Inicialmente se trabajó con membranas de ovocitos no inyectados y, posteriormente, para comprobar que la metodología aplicada permitía la obtención de proteínas de membrana, se trabajó con ovocitos que expresaban la proteína de membrana marcadora P2X4-GFP.

Se obtuvieron 50 ovocitos de una rana *Xenopus laevis*; estos fueron tratados con colagenasa y desfoliculados en las condiciones detalladas en la sección de Métodos. De este grupo se tomaron 42 ovocitos para su homogenización, centrifugación y extracción de membranas. La concentración de proteínas obtenida fue de 30.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para analizar cualitativamente la muestra se realizó SDS-PAGE; se cargaron tres cantidades distintas de proteína total (100, 50 y 25 μg) y el gel fue teñido con nitrato de plata (Figura 7).

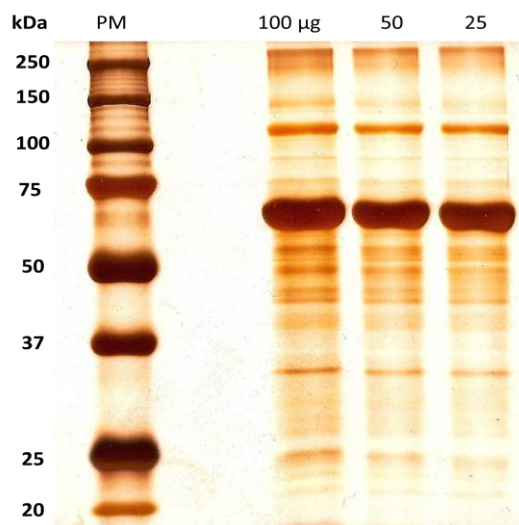


Figura 7. Electroforesis de membranas totales extraídas de ovocitos no inyectados. El gel de poliacrilamida fue preparado al 10% y teñido con nitrato de plata.

Para comprobar que proteínas expresadas de manera heteróloga en la membrana del ovocito pueden ser resueltas aplicando estas metodologías, fue utilizada como proteína marcadora el receptor purinérgico P2X4 fusionado a la proteína verde fluorescente (P2X4-GFP).

Para esto fueron microinyectados 15 ovocitos con 0.05 μl de cRNA de P2X4-GFP (concentración: 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Posteriormente, los ovocitos tanto del grupo control (no inyectado) como del grupo inyectado con el cRNA fueron incubados en solución Barth durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se comprobó la expresión de la proteína quimérica P2X4-GFP en el grupo inyectado, por métodos electrofisiológicos y mediante la visualización de fluorescencia en los ovocitos (Figura 8). Inmediatamente después se homogenizaron los dos grupos de ovocitos y se

purificaron las membranas. La concentración de proteínas en las preparaciones fue cuantificada por el método de Bradford.

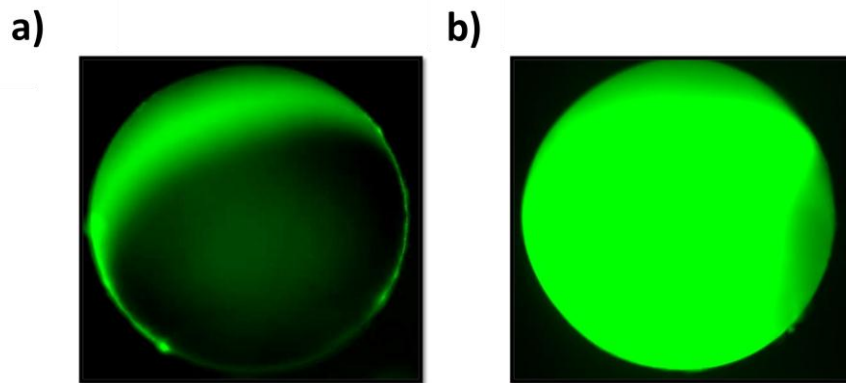


Figura 8. Microscopía de fluorescencia (10X) para evaluar la expresión de P2X4-GFP en ovocitos de *Xenopus laevis*. a) Ovocitos no inyectados; b) ovocitos que expresan P2X4-GFP. Los ovocitos no inyectados presentaron fluorescencia basal, pero se distingue claramente el polo animal del vegetal; por el contrario, en los ovocitos inyectados, la fluorescencia es mucho más intensa y casi uniforme en los polos animal y vegetal.

Posteriormente, el volumen equivalente a 100 μ g de proteína de la preparación de membranas fue analizado por SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF, las cuales fueron analizadas por Western blot para identificar la proteína quimérica usando los anticuerpos para ambas, P2X4 y GFP (como se describió en los métodos).

Finalmente, las proteínas inmunorreactivas fueron detectadas en el carril correspondiente a las muestras de ovocitos inyectados, las bandas aparecen cerca del peso esperado de 72 kDa (Figura 9). Este resultado sugiere que la metodología aplicada permite la obtención de membranas de ovocitos que expresan proteínas de forma heteróloga.

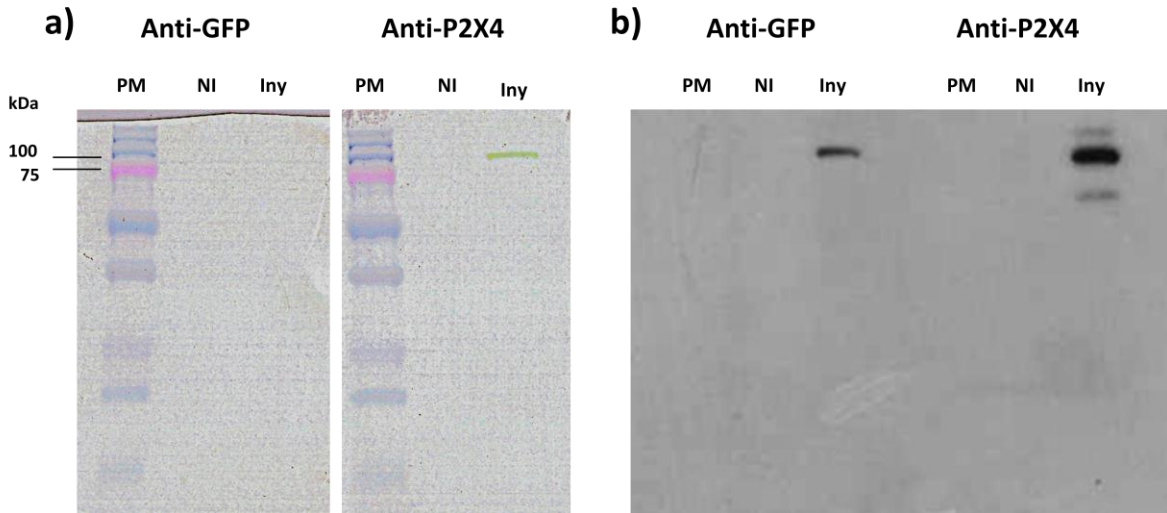


Figura 9. Western blot para P2X4-GFP. a) Membranas de PVDF incubadas con anticuerpos anti-GFP o anti-P2X4 (NI= No inyectados, Iny= expresando P2X4-GFP, PM= estándares de peso molecular preteñidos). b) Autorradiograma mostrando la señal obtenida con ambos anticuerpos.

7.2 Estandarización del marcaje de fotoafinidad con [³H]-F, utilizando proteínas de membrana provenientes de ovocitos nativos e inyectados con el cRNA de la proteína marcadora SERT

Después de que demostramos la factibilidad de obtener y separar proteínas de membrana provenientes del ovocito, el segundo paso fue utilizar membranas de ovocitos para estandarizar el marcaje de afinidad con fluoxetina tritiada ([³H]-F). Para este propósito fue necesario expresar en el ovocito una proteína que uniera [³H]-F con una afinidad conocida, por lo que se decidió trabajar con el blanco canónico de este fármaco, el SERT.

La expresión del SERT se realizó como sigue: se inyectaron 30 ovocitos con 0.05 μ l de cRNA que codifica para el SERT (1.8 μ g/ μ l). Estos fueron tratados en las condiciones adecuadas y, con la finalidad de evaluar la expresión funcional del transportador, se realizaron registros electrofisiológicos de los ovocitos inyectados y no inyectados (grupo control) del mismo donador. Los ovocitos inyectados con el cRNA respondieron a la aplicación de 100 μ M de 5-HT, generando corrientes promedio de 25.55 ± 4 nA a -60 mV y de 38.67 ± 4 nA controlando el potencial de membrana a -100 mV. La corriente generada fue inhibida por completo cuando el

agonista fue co-aplicado en solución Ringer 0Na^+ , en cualquiera de los potenciales utilizados. Los ovocitos control (no inyectados) no respondieron a la aplicación de 5-HT 0.1-1 mM (Figura 10).

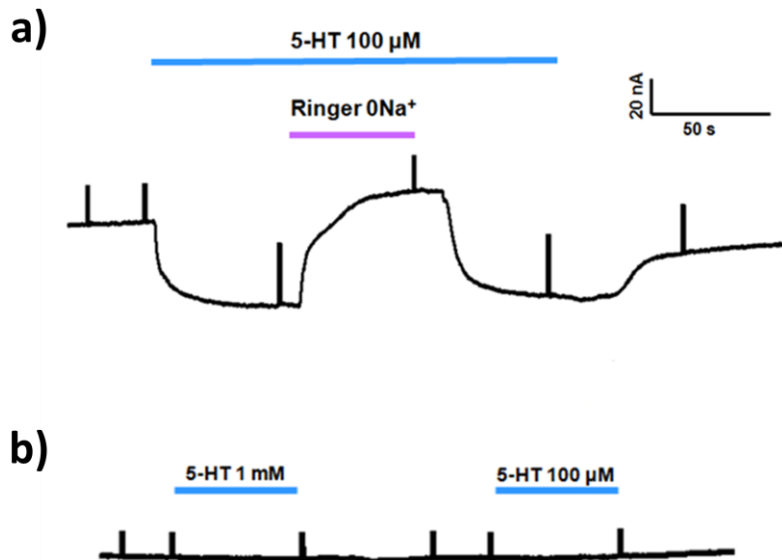


Figura 10. a) Corriente generada por 5-HT en ovocitos inyectados con cRNA del SERT (-60 mV). La corriente entrante generada fue inhibida cuando fue substituido el ión Na^+ por NMDG^+ en el medio extracelular; b) Los ovocitos control no respondieron a la aplicación de 5-HT.

Una vez comprobada la expresión funcional del SERT en los ovocitos inyectados, se procedió a la homogenización y obtención de las membranas. La concentración de proteínas obtenida fue de $48 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el grupo control y $45.9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el grupo inyectado. Se realizó el marcaje de afinidad con $200 \mu\text{g}$ de proteína y 20 nM de $[\text{}^3\text{H}]\text{-F}$, tal y como se describió en los métodos; después de la precipitación con TCA-DOC, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE con $60 \mu\text{g}$ de proteínas en cada carril. Se analizaron además, en estos mismos geles, muestras de ambos grupos (C= membranas control; S= membranas de ovocitos expresando el SERT) que no fueron sometidas al ensayo de fotoafinidad. Uno de los geles fue teñido con nitrato de plata para verificar la presencia e integridad de las muestras proteicas (Figura 11); la presencia de bandas definidas en la tinción indicó la integridad de las proteínas. El segundo gel fue sometido al método fluorográfico con PPO. En la

Figura 12a se muestra el gel impregnado con PPO. En la Figura 12b se muestra el autorradiograma del gel después de 5 días de exposición a -70°C .

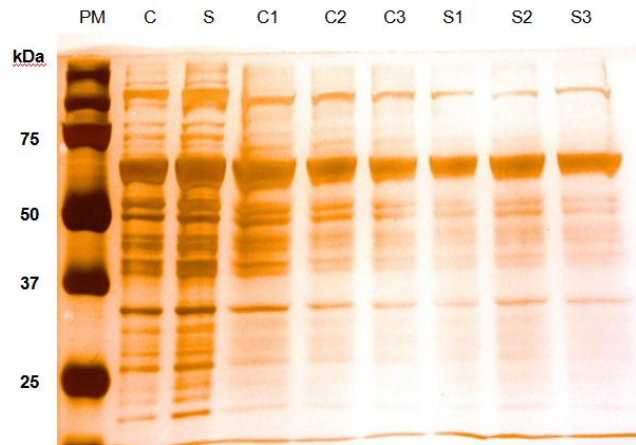


Figura 11. SDS-PAGE al 8% teñido con nitrato de plata de muestras de marcaje de fotoafinidad con $[^3\text{H}]\text{-F}$. Los carriles en el gel contienen: (C) membranas control, (S) membranas de ovocitos que expresaron al SERT; (C1 y S1= no competido; C2 y S2= competido con $10\ \mu\text{M}$ de fluoxetina fría; C3 y S3= competido con $100\ \mu\text{M}$ de fluoxetina fría).

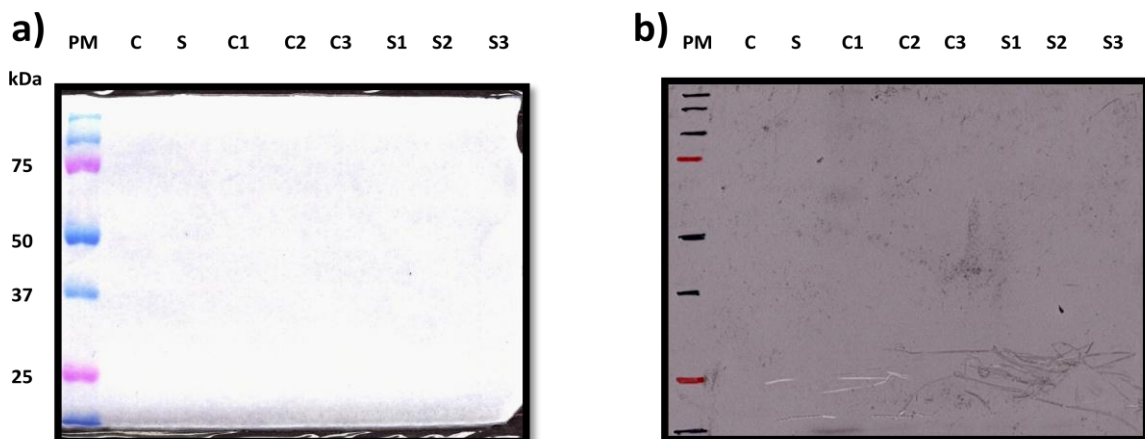


Figura 12. Marcaje de fotoafinidad con $[^3\text{H}]\text{-F}$. a) Gel impregnado con PPO. b) Autorradiograma obtenido después de la exposición del gel (5 días, -70°C). Los carriles contienen: (C) membranas control, (S) membranas de ovocitos que expresaron al SERT; (1= no competido; 2= competido con $10\ \mu\text{M}$ de fluoxetina fría; 3= competido con $100\ \mu\text{M}$ de fluoxetina fría).

La imagen autorradiográfica obtenida en el primer ensayo de fotoafinidad (Figura 12b) no resultó en marcas consistentes, sin embargo fue observada una señal débil en el carril C1. Pensando que el tiempo de exposición fue un factor determinante, se preparó un segundo gel con las mismas muestras y en las mismas condiciones que los anteriores, pero esta vez el tiempo de exposición a la película fue de 20 días (Figura 13).

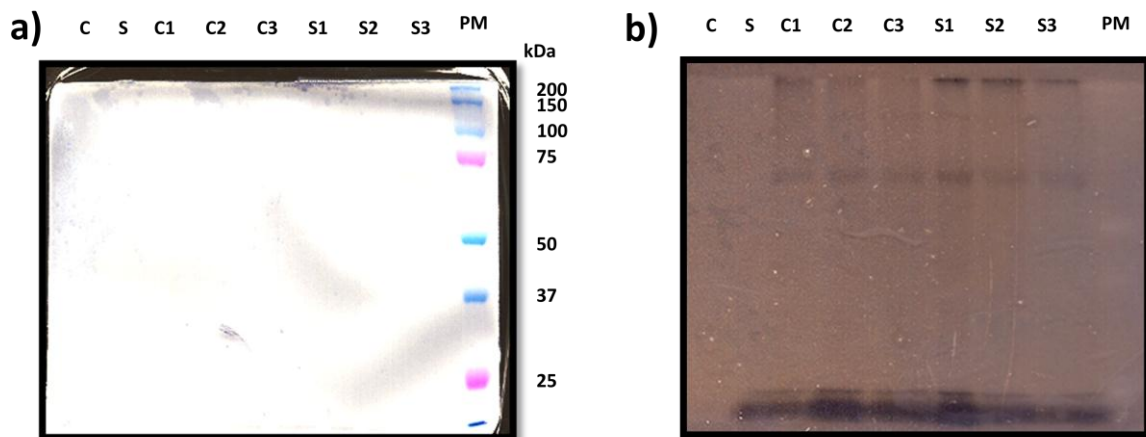


Figura 13. Marcaje de fotoafinidad con [^3H]-F. a) Gel impregnado con PPO. b) Autorradiograma mostrando la señal obtenida después de la exposición del gel durante 20 días a $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

En este segundo ensayo pueden visualizarse tres bandas, la primera $>200\text{ kDa}$, la segunda de $\approx 130\text{ kDa}$ y una de $\approx 70\text{ kDa}$. Estas bandas aparecen en todos los carriles que tienen muestra del marcaje de afinidad, aún y cuando los carriles C1-3 no contienen la proteína SERT; por tanto, es posible que el fármaco esté presentando uniones inespecíficas con varias proteínas de la muestra.

Sin embargo, las bandas de $\approx 70\text{ kDa}$ y $>200\text{ kDa}$ están enriquecidas en el carril S1 y se observó competencia en los carriles S2 y S3. La Figura 14 muestra el análisis de la densidad óptica de estas dos bandas (la señal más débil de la banda de $\approx 130\text{ kDa}$ no hizo posible el análisis para esta banda). El peso esperado del transportador es de 73 kDa , por lo que es posible que un componente de la señal de $\approx 70\text{ kDa}$ en los carriles S1-S3 se deba a la unión del SERT con [^3H]-F (Figura 14a). Por otro lado, existe también la posibilidad de que el complejo SERT-fluoxetina no migrara adecuadamente y se mantuviera en la parte superior del gel, en $>200\text{ kDa}$, y ésta fue

la razón por la cual se observó la competencia en los carriles S1-S3 a este nivel (Figura 14b).

En la sección de discusión se analizará con detalle las posibles causas de estos resultados.

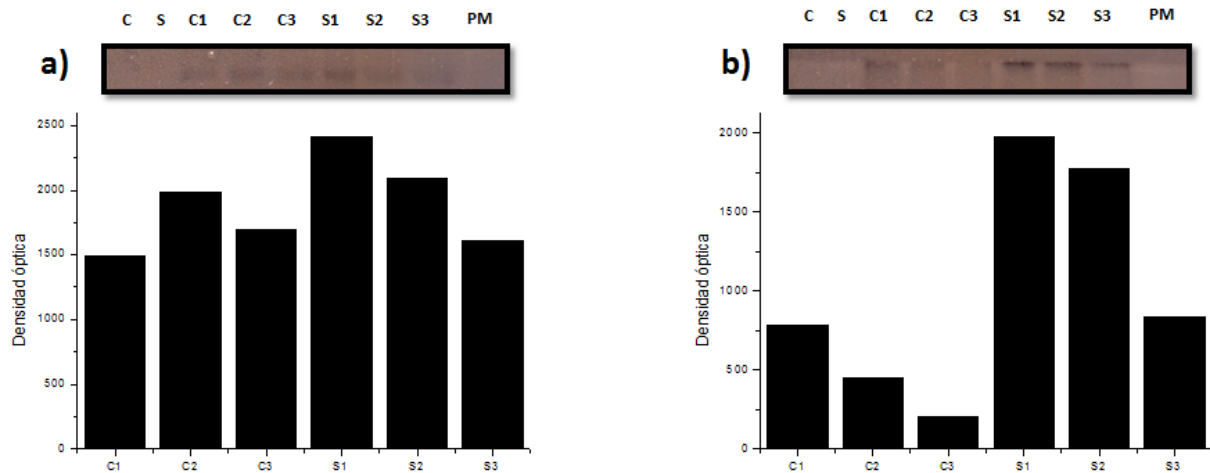


Figura 14. Densitometría de las bandas de a) ≈ 70 kDa y b) >200 kDa obtenidas en el autorradiograma del marcaje con $[^3\text{H}]\text{-F}$. Las dos bandas muestran una competencia en los carriles S1, S2 y S3.

7.3 Estandarización del marcaje de afinidad con $[^3\text{H}]\text{-NMS}$, utilizando proteínas de membrana provenientes de ovocitos nativos e inyectados con el cRNA de la proteína marcadora M1

Para continuar con la estandarización del método de marcaje se utilizó la $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ y ovocitos expresando el receptor de ACh muscarínico tipo M1, que tiene un peso molecular de 51 kDa; la $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ se une a este receptor con una afinidad de 0.25 nM (Oki et al., 2005).

De forma similar a lo realizado en los ensayos con fluoxetina, se inyectaron 15 ovocitos con 0.05 μl de cRNA que codifica para el receptor M1 (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Éstos fueron tratados en las condiciones establecidas y se evaluó la expresión funcional del receptor mediante registro electrofisiológico de los ovocitos inyectados y no inyectados del mismo donador. Los ovocitos inyectados con el cRNA respondieron a la perfusión de 100 μM de ACh, generando corrientes promedio de $3.4 \pm 1.5 \mu\text{A}$

(n=3). Los ovocitos control también presentaron expresión nativa respondiendo a la aplicación de ACh con corrientes promedio de $0.98 \pm 0.97 \mu\text{A}$ (n=3; Figura 15).

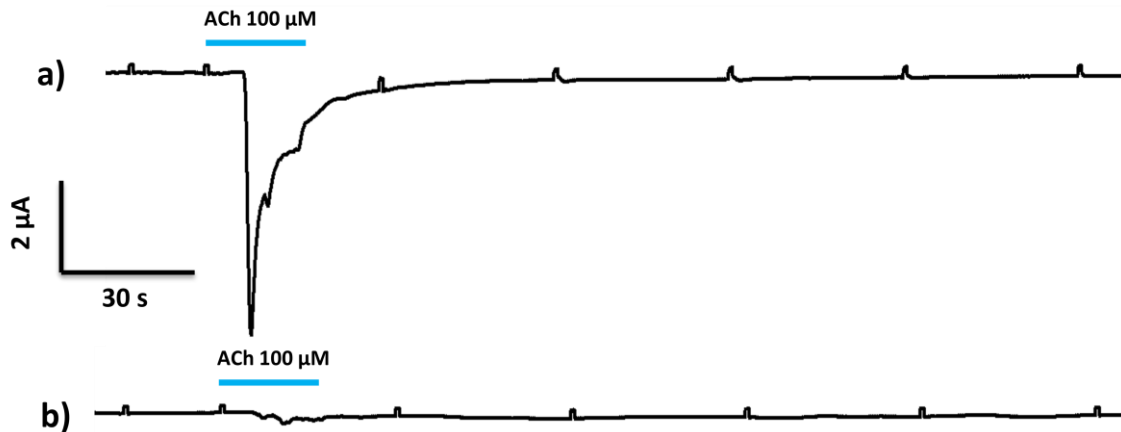


Figura 15. a) Corriente entrante ($5.56 \mu\text{A}$) generada por ACh en un ovocito inyectado con cRNA de M1. b) Los ovocitos no inyectados presentaron corrientes nativas pequeñas del orden de nA.

Posteriormente, se procedió a la homogenización y obtención de las membranas: la concentración de proteínas fue de $20.13 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el grupo control y $40.8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el grupo inyectado.

Se realizó el marcaje de afinidad con $200 \mu\text{g}$ de proteína y 100 nM de $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ en un volumen total de $300 \mu\text{l}$. Para definir la magnitud de la unión inespecífica se utilizó como competidor atropina 10 y $100 \mu\text{M}$. En este caso, el entrecruzamiento se realizó con glutaraldehído (como se describió en los métodos). La precipitación de las proteínas (TCA-DOC), la SDS-PAGE y el autorradiograma se realizaron de la misma manera que para el marcaje con $[^3\text{H}]\text{-F}$ (Figura 16).

Es probable que el método de entrecruzamiento con glutaraldehído formara agregados entre todas las proteínas de la muestra, debido a que el gel en la Figura 16a no muestra bandas definidas y la película (Figura 16b) no mostró señal.

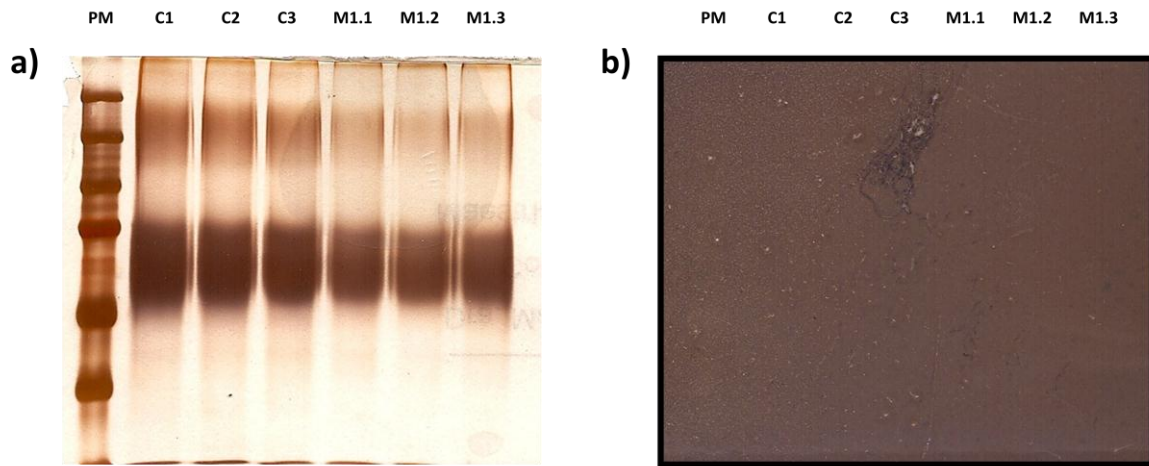


Figura 16. Marcaje de afinidad con $[^3\text{H}]\text{-NMS}$. Los carriles contienen: membranas control (C), membranas de ovocitos inyectados con cRNA de M1 (M1); marcaje de afinidad (1= no competido; 2= competido con $10\ \mu\text{M}$ de atropina; 3= competido con $100\ \mu\text{M}$ de atropina). a) Gel al 8% teñido con nitrato de plata. b) Autorradiograma después de la exposición del gel (20 días, $-70\ ^\circ\text{C}$).

Con los resultados obtenidos en el presente estudio es posible realizar un análisis de cuáles son los posibles factores clave en la estandarización del marcaje de afinidad y cuáles podrían ser las condiciones experimentales necesarias para implementarlo de manera óptima.

8. DISCUSIÓN

Primeras aportaciones del presente estudio para el desarrollo del método BILBOX

El presente estudio forma parte del desarrollo de un nuevo método para la búsqueda e identificación de proteínas blanco, ya sea de nuevos fármacos o de sustancias conocidas y utilizadas terapéuticamente de manera exitosa, pero que se sabe o sospecha que se unen a diversos blancos moleculares. El primer objetivo específico en este estudio, correspondió a los pasos fundamentales que deben ser resueltos metodológicamente para estandarizar la obtención de membranas de ovocitos de *Xenopus laevis* que han sido tratados para expresar proteínas de membrana de forma heteróloga. Aquí mostramos que utilizando ovocitos no inyectados e inyectados con cRNA de proteínas diana se logró aislar las membranas mediante

homogenización y centrifugación diferencial. La presencia de la proteína P2X4-GFP fue detectada mediante SDS-PAGE y Western blot (Figuras 7, 8 y 9). El análisis fue realizado utilizando 2 anticuerpos, uno dirigido contra P2X4 y otro contra GFP; de este modo se esperaba detectar una banda de 72 kDa en las dos membranas incubadas con uno de los dos anticuerpos utilizados. Como resultado de este análisis observamos la presencia de una banda inmunoreactiva principal que se observa por arriba de los 75 kDa. Dicha banda fue identificada con ambos anticuerpos, confirmando la presencia de la proteína quimérica P2X4-GFP. Con este resultado mostramos que las metodologías de purificación y separación aplicadas son eficientes para la obtención de una muestra enriquecida de proteínas de membrana que han sido traducidas en el sistema de expresión heteróloga de ovocito de *Xenopus laevis*.

Dos conceptos de suma importancia en el contexto del presente proyecto son la afinidad y especificidad con que un fármaco o ligando se une a su blanco; estas propiedades permiten analizar su unión utilizando radioligandos (Flórez et al., 2003). A continuación se describen y analizan los resultados obtenidos en los marcajes de afinidad.

Estandarización del marcaje por fotoafinidad utilizando [³H]-F

El siguiente paso consistió en realizar y verificar la expresión funcional del SERT en el ovocito, para proceder después a la estandarización del marcaje de afinidad. Después de la inyección de 90 ng de cRNA del SERT, los ovocitos respondieron a la aplicación de 100 μ M de 5-HT, generando corrientes de una magnitud semejante a la obtenida en otros estudios (24 ± 3 nA con 10 μ M de 5-HT a -40 mV en Lin et al., 1996), mientras que los ovocitos no inyectados no mostraron respuesta. La Figura 10 muestra un trazo representativo de las corrientes expresadas obtenidas en el registro. Este resultado confirma que la expresión funcional del SERT en la membrana del ovocito de *Xenopus laevis* mediante la inyección del cRNA se realizó exitosamente.

La estandarización del marcaje de fotoafinidad con [³H]-F se realizó utilizando proteínas de membrana provenientes de ovocitos no inyectados y ovocitos expresando el SERT evidenciado por los estudios electrofisiológicos. Las muestras proteicas obtenidas fueron evaluadas por SDS-PAGE. El gel de la Figura 11 demuestra la presencia de proteínas intactas en la muestra, ya que se observan bandas bien definidas en cada carril. Esto significa que la precipitación de proteínas después del marcaje de afinidad fue exitosa. El autorradiograma obtenido (Figura 12b) después de la exposición del gel por 5 días (-70 °C) mostró una señal débil, que además está en un carril que contiene muestra de membranas de ovocitos control no inyectados (carril C1). Dado este resultado poco confiable, se decidió evaluar nuevamente las muestras y correr un segundo gel para el cual se alargó el tiempo de exposición del autorradiograma a 20 días (Figura 13). Esta modificación del tiempo de exposición permitió observar señales de marcado. Este segundo gel indicó que las marcas se observan en todos los carriles que contienen muestra del ensayo de fotoafinidad (membranas control y membranas que contienen el SERT). Esto sugirió que probablemente [³H]-F esté presentando uniones inespecíficas con las proteínas más abundantes presentes en las muestras, pues las señales observadas en el autorradiograma (la primera >200 kDa, la segunda de ≈130 kDa y una de ≈70 kDa) corresponden a bandas observadas en los geles de membranas de ovocitos teñidos con nitrato de plata (Figuras 7 y 11).

Sin embargo, la Figura 14 muestra que las bandas de ≈70 kDa y >200 kDa están enriquecidas en el carril S1 y la marca fue competida por la fluoxetina fría en los carriles S2 y S3. Es posible que un componente de la señal en estos carriles se deba a la unión de [³H]-F al SERT que disminuyó con la adición de 10 y 100 μM de fluoxetina fría.

En el caso de la marca >200 kDa, el peso molecular es mayor al esperado para el SERT, pero es posible que el transportador esté formando complejos o agregados con otras proteínas; quizá estos agregados estabilizaron interacciones con el entrecruzamiento al que las muestras se someten y dado su gran tamaño no pudieron migrar adecuadamente en el gel.

Por su parte, la señal en ≈ 70 kDa es cercana al peso de la banda prominente que se observa en los geles de membranas de ovocitos teñidos con nitrato de plata; es posible que se trate de la albúmina sérica bovina (BSA) necesaria en la solución de resuspensión de membranas, cuyo peso es de 67 kDa. Según datos farmacocinéticos reportados, la fluoxetina *in vitro* se une a proteínas plasmáticas humanas en un 95%, incluyendo la albúmina y la glucoproteína $\alpha 1$ (Salazar et al., 2010).

Sin embargo, aún cuando gran parte de la señal se deba a la unión de BSA con fluoxetina, en los carriles S1-S3 se observa un ligera competencia (Figura 14a) y como el peso esperado para el SERT es de 73 kDa, la señal emitida por la unión de [3 H]-F a SERT debe encontrarse también en este mismo nivel o muy cercano.

Para poder inferir acerca de las marcas radiactivas observadas y la posibilidad de que se deban o no a la interacción de [3 H]-F con BSA y SERT, es necesario realizar cálculos para conocer el número aproximado de moléculas blanco contenidas en el ensayo y compararlo con el número mínimo necesario de moléculas para ver una marca en la película. Se sabe que es necesario que los sitios de unión del radioligando estén presentes en un promedio de 10-100 nM, para que un solo átomo de tritio por molécula de ligando permita una imagen autorradiográfica con tiempo de exposición de 5-7 días (Frey y Albin, 2001). La concentración menor de 10 nM corresponde a 6.023×10^9 moléculas por μ l; por tanto, a 30 μ l (volumen de carga en el gel de poliacrilamida) corresponden 1.8×10^{11} moléculas, que es entonces el número mínimo necesario de moléculas blanco por carril para poder observar una señal radiactiva en la película después del marcaje con [3 H]-F.

El número aproximado de moléculas de SERT contenidas en cada carril del gel después del ensayo de fotoafinidad fue estimado como sigue: los datos de la cuantificación de proteínas realizada por el método de Bradford (después de la homogenización, centrifugación y resuspensión de los ovocitos inyectados con cRNA de SERT) muestra que se obtuvieron en promedio 92 μ g de proteína por ovocito. Para realizar el marcaje de fotoafinidad se incubaron 200 μ g de proteína; después del marcaje y la precipitación con TCA-DOC, la muestra se resuspendió en 50 μ l de la solución indicada, lo que genera, suponiendo que se recuperen los 200

μg del marcaje, una muestra con concentración de $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. De aquí, $30 \mu\text{l}$ (volumen de carga en la electroforesis) corresponden a $120 \mu\text{g}$ de proteína en cada carril. En estudios anteriores se ha determinado la densidad de SERT en el ovocito tras la inyección del cRNA; se reporta una B_{max} de $76 \pm 16 \text{ fmol}$ por ovocito, lo que corresponde a 4.6×10^{10} moléculas de transportador por ovocito (Mager et al., 1994; Lin et al., 1996). Teniendo en cuenta que de un ovocito se obtuvieron $92 \mu\text{g}$, $120 \mu\text{g}$ de proteína en cada carril corresponden aproximadamente a 1.3 ovocitos, mismos que según Mager y colaboradores (1994) expresarían un total aproximado de 6×10^{10} moléculas de SERT. Este número de moléculas se encuentra por debajo de lo que hemos calculado como el mínimo necesario (1.8×10^{11}) para observar una señal radiactiva por lo que podría ser la causa principal de la señal débil reportada en el autorradiograma.

Estos datos sugieren que no sería posible observar señal radiactiva debido a la interacción con el transportador, utilizando moléculas marcadas con ^3H . Suponiendo entonces, que la señal $\approx 70 \text{ kDa}$ se deba a la interacción de $[^3\text{H}]\text{-F}$ con BSA se pensó que este complejo puede ser de utilidad para darnos información sobre la sensibilidad de detección que venimos discutiendo.

La BSA estaba presente en la solución de resuspensión de membranas en una concentración de 0.1%. La cuantificación de las muestras de proteínas de membrana fue de $45.9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el grupo inyectado con cRNA del SERT y $48 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el control. Se tomó el equivalente a $200 \mu\text{g}$ para el marcaje de afinidad, es decir, 4.4 y $4.2 \mu\text{l}$, respectivamente, volumen en el cual están contenidos en promedio $4.3 \mu\text{g}$ de BSA. Después del marcaje con $[^3\text{H}]\text{-F}$ y la precipitación con TCA-DOC, la muestra proteica se resuspendió nuevamente en un volumen de $50 \mu\text{l}$ y contenía BSA en una concentración de $0.086 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. En el volumen de $30 \mu\text{l}$ que se cargaban en cada carril habían alrededor de $2.58 \mu\text{g}$ de BSA, que son aproximadamente 2.32×10^{13} [$(2.58 \times 10^{-6} \text{ g}/67000 \text{ g/mol}) \times 6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol} = 2.3193 \times 10^{13}$] moléculas de BSA, un número suficiente de moléculas para hacer la señal visible si la posible interacción de fluoxetina con BSA tuviera una estequiometría 1:1.

Respecto a la sensibilidad de detección autorradiográfica hemos estimado que la cantidad de moléculas blanco disponibles en el ensayo (al menos con respecto a los transportadores tipo el SERT) parecen no ser suficientes para hacer visible una señal radiactiva emitida por tritio. Sin embargo, es conveniente tener presente que este cálculo es sólo una estimación y que de ninguna manera refleja el número exacto de moléculas presentes en el ensayo. Además, como se mencionó anteriormente, el análisis realizado a la banda de >200 kDa (Figura 14b) sugiere que la marca observada se debe a la unión de [³H]-F al SERT.

En el caso de que, como hemos estimado, el número de moléculas blanco expresadas en el ovocito fuera insuficiente para realizar exitosamente el marcaje de fotoafinidad, una solución al problema sería modificar el umbral de detección utilizando radioisótopos de mayor emisión energética; cuando la densidad de los sitios de unión de los blancos es sustancialmente baja se usan radioisótopos con una alta actividad específica, el más empleado es el ¹²⁵I que incrementa la señal 100 veces respecto de la marca generada por tritio (Frey y Albin, 2001).

Por otro lado, es conveniente resaltar los detalles del entrecruzamiento realizado con luz UV, pues consideramos que éste es también un paso crítico en el diseño del modelo planteado. El marcaje de fotoafinidad es una técnica en la que usualmente se añade al ligando un grupo fotoactivable por luz UV (fenilazida, benzofenona o diazirinas). La [³H]-F no fue sometida a este cambio químico en su estructura y, sin embargo, nuestros resultados indicaron que la luz UV entrecruza el fármaco con las proteínas, pues fue posible realizar la electroforesis sin que el complejo se disociara. Lo anterior se debe a que existen ligandos que contienen grupos fotoactivables intrínsecos, como lo son moléculas que contienen grupos sulfuros, enonas, dienonas y halógenos (Robinette et al., 2006). La fluoxetina posee tres átomos de flúor en su estructura molecular, y éste es un elemento químico del grupo de los halógenos que representa un candidato del grupo fotoactivable intrínseco.

Estandarización del marcaje de afinidad utilizando [³H]-NMS

Por su parte, los ensayos con [³H]-NMS son llamados marcajes de afinidad y no de fotoafinidad porque esta molécula no contiene un grupo activable por luz UV, razón por la cual el entrecruzamiento se realizó con un agente químico, el glutaraldehído. El glutaraldehído ha sido usado por muchos años como un agente entrecruzador para muchas aplicaciones, incluyendo fijación de muestras para citoquímica y microscopía electrónica. Sin embargo, el mecanismo y la química involucrada en este proceso no están bien entendidos (Wine et al., 2007). El glutaraldehído reacciona con varios grupos funcionales presentes en las proteínas, por ejemplo aminas, tioles, fenoles e imidazoles, aunque al parecer su efecto entrecruzador está dominado por reacciones con los grupos ε-amino de los residuos de lisina; de esta forma el glutaraldehído se utiliza para entrecruzar proteínas que normalmente interaccionan o están muy próximas (Melcher y Chen, 2007). Dado que la molécula de escopolamina contiene una amina terciaria se pensó en la posibilidad de aplicar glutaraldehído (que forma enlaces con aminas) para entrecruzar el fármaco a la proteína M1. El resultado no fue exitoso ya que nuestros resultados sugieren que el efecto del glutaraldehído fue formar agregados de todas las proteínas de la muestra, debido a que en el gel teñido con nitrato de plata (Figura 16a) no se apreciaron bandas de proteínas definidas. Este resultado no permitió la identificación de una señal radiactiva definida en la película (Figura 16b).

Los hallazgos con los dos métodos de entrecruzamiento: la radiación con luz UV y el glutaraldehído, utilizados en este proyecto para la estandarización del marcaje con [³H]-F y [³H]-NMS, respectivamente, sugieren que el uso de un fármaco con un grupo fotoactivable por luz UV es la mejor alternativa para realizar el entrecruzamiento. Sin embargo, antes es necesario realizar más experimentos para determinar si el método propuesto no genera la formación de uniones inespecíficas entre el fármaco y distintos blancos o incluso uniones entre las mismas proteínas, que son también reforzadas por este entrecruzamiento.

La limitación más importante en este sentido, es quizá, la necesidad de modificar químicamente el fármaco, primeramente con la adición de un isótopo radiactivo y posteriormente con un grupo fotoactivable para realizar el entrecruzamiento. Ambas

modificaciones requieren previamente de estudios de relación estructura-actividad que permitan conocer los grupos funcionales que son indispensables en la bioactividad del fármaco, para así elegir un sitio en la molécula en donde insertar el isótopo y el grupo fotoactivable sin afectar sus funciones. El hacer un derivado de un fármaco, en este caso un radiofármaco y/o un análogo fotoactivable, consume mucho tiempo y requiere de mucha experiencia en varios campos como lo son la química sintética, química medicinal, bioquímica y modelaje molecular (Lomenick et al., 2009).

Perspectivas

Con los resultados obtenidos en este trabajo, referentes a la estandarización de la segunda parte del método BILBOX, podemos plantear modificaciones metodológicas para proporcionar viabilidad al método propuesto, señalando algunas ventajas y analizando sus limitaciones, que en un momento dado impidan que éste sea eficientemente implementado como una herramienta útil en la búsqueda de interacciones ligando-blanco.

Por ejemplo, los experimentos realizados para estandarizar el marcaje de afinidad proveen información muy importante para continuar con la implementación del método propuesto: 1) se recomienda el uso de fármacos que contengan un grupo fotoactivable para el eficiente entrecruzamiento con luz UV; 2) existe la posibilidad de que el número de blancos moleculares obtenidos por expresión heteróloga en el ovocito requiera el uso de radiofármacos de alta emisión energética para una eficiente detección autorradiográfica; y 3) es necesario verificar las posibles uniones inespecíficas que se generan en el marcaje de afinidad, que son reforzadas por el entrecruzamiento (e.g., sustitución de BSA en el procedimiento).

9. CONCLUSIONES

- 1) El método empleado para la obtención de las membranas de ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan proteínas de forma heteróloga proporciona muestras de calidad y cantidad adecuadas para su uso en BILBOX.
- 2) La sensibilidad de detección está dentro del rango que permitiría identificar la unión de fármacos a proteínas expresadas en la membrana del ovocito, pero es probable que se requiera aumentar la intensidad de las señales del complejo utilizando marcas radiactivas de mayor emisión de energía.
- 3) El método de entrecruzamiento más eficiente fue el de marcaje por fotoafinidad comparado con el llevado a cabo con glutaraldehído, por lo que se requiere el uso de fármacos análogos fotoactivables.

10. REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2008). Molecular Biology of the Cell. 5th edition, Galland Science, New York: 517-518.
- 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 RO, Woodward R, Miledi R. (1996). Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. En Narahashi T. Ion Channels, volume 4. Plenum press, New York: 203-259.
- Bigott-Hennkens HM, Dannoon S, Lewis MR, Jurisson SS. (2008). In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag. 52: 245-253.

Bollag DM, Edelstein SJ. (1991). Protein Methods. Inc., New York: 72, 73 y 133.

Carlson NR. (1999). Fisiología de la Conducta. Ariel Neurociencia, España: 629-631.

Dawson JS. (2003). Lo esencial en Farmacología. 2a edición, Elsevier, España: 8-9.

Ebert U, Kirch W. (1998). Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. Eur. J. Clin. Invest. 28:944-949.

Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. (2003). Farmacología Humana. 4a edición, Masson, España: 42-44.

Frey KA, Albin RL. (2001). Receptor binding techniques. Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 1:Unit1.4.

García-Colunga J, Awad JN, Miledi R. (1997). Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94: 2041-2044.

Gryniewicz G, Gadzikowska M. (2008). Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. Pharmacol. Rep. 60: 439-463.

Hardman JG, Limbird LE. (2004). Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10a edición, McGraw-Hill, México: 22-39.

Hille B. (1992). Ion channels of excitable membranes. 2nd edition, Sinauer Associates INC, USA: 30-33.

Hopkins AL. (2009). Drug discovery: Predicting promiscuity. Nature 462: 167-168.

Hulme EC, Lu ZL, Saldanha JW, Bee MS. (2003). Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. Biochem. Soc. Trans. 31: 29-34.

Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ, Jensen NH, Kuijter MB, Matos RC, Tran TB, Whaley R, Glennon RA, Hert J, Thomas KL, Edwards DD, Shoichet BK, Roth BL. (2009). Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* 462: 175-181.

Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, Armstrong SJ, Veale EL, Mathie A. (2005). Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br. J. Pharmacol.* 144: 821-829.

Klinkenberg I, Blokland A. (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34: 1307-1350.

Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K. (2003). Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by fluoxetine (Prozac). *Br. J. Pharmacol.* 138: 1119-1128.

Laskey RA, Mills AD. (1975). Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56: 335-341.

Lemke TL, Williams DA. (2008). Foye's Principles of medicinal chemistry. 6th edition, Wolters Kluwer Health, USA: 85, 490-494.

Lin F, Lester HA, Mager S. (1996). Single-channel currents produced by the serotonin transporter and analysis of a mutation affecting ion permeation. *Biophys. J.* 71: 3126-3135.

Lomenick B, Hao R, Jonai N, Chin RM, Aghajani M, Warburton S, Wang J, Wu RP, Gomez F, Loo JA, Wohlschlegel JA, Vondriska TM, Pelletier J, Herschman HR, Clardy J, Clarke CF, Huang J. (2009). Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106: 21984-21989.

Mager S, Min C, Henry DJ, Chavkin C, Hoffman BJ, Davidson N, Lester HA. (1994). Conducting states of a mammalian serotonin transporter. *Neuron* 12: 845-859.

Melcher K, Chen HT. (2007). Identification and analysis of multiprotein complexes through chemical crosslinking. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 17: Unit 17.10.

Miledi R, Parker I, Sumikawa K. (1989). Transplanting receptors from brains into oocytes. *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures*, Raven Press, New York: 57-90.

Morales-Toxqui AL. (2011, en proceso). Efecto de la fluoxetina sobre proteínas de membrana del sistema nervioso central de mamíferos expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*. Tesis Maestría en Ciencias, Instituto de Neurobiología UNAM, Juriquilla, Qro.

Ni YG, Miledi R. (1997). Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 2036-2040.

Oki T, Takagi Y, Inagaki S, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Yamada S. (2005). Quantitative analysis of binding parameters of [³H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 133: 6-11.

Pancrazio JJ, Kamatchi GL, Roscoe AK, Lynch C 3rd. (1998). Inhibition of neuronal Na⁺ channels by antidepressant drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284: 208-214.

Park KS, Kong ID, Park KC, Lee JW. (1999). Fluoxetine inhibits L-type Ca²⁺ and transient outward K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Yonsei Med. J.* 40: 144-151.

PLM. (2006). *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas Tomo II*.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. (2004). *Farmacología*. 5a edición, Elsevier, España: 535-546.

Robinette D, Neamati N, Tomer KB, Borchers CH. (2006). Photoaffinity labeling combined with mass spectrometric approaches as a tool for structural proteomics. *Expert. Rev. Proteomics* 3: 399-408.

Robinson RT, Drafts BC, Fisher JL. (2003). Fluoxetine increases GABA_A receptor activity through a novel modulatory site. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 978-984.

Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3: 353-359.

Salazar M, Peralta C, Pastor FJ. (2010). *Tratado de psicofarmacología*. 2a edición, Editorial Médica Panamericana, España: 655-660.

Schmeller T, Sporer F, Sauerwein M, Wink M. (1995). Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie* 50: 493-495.

Siegel G, Albers RW, Brady S, Price D. (2006). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7th edition, Canada: 211-245.

Szasz BK, Mike A, Karoly R, Gerevich Z, Illes P, Vizi ES, Kiss JP. (2007). Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biol. Psychiatry* 62: 1303-1309.

Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. (1997). Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur. J. Pharmacol.* 340: 249-258.

Traboulsie A, Chemin J, Kupfer E, Nargeot J, Lory P. (2006). T-type calcium channels are inhibited by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Mol. Pharmacol.* 69:1963-1968.

Tytgat J, Maertens C, Daenens P. (1997). Effect of fluoxetine on a neuronal, voltage-dependent potassium channel (Kv1.1). *Br. J. Pharmacol.* 122: 1417-1424.

White KJ, Walline CC, Barker EL. (2005). Serotonin transporters: implications for antidepressant drug development. *APPS* 7: 421-433.

Wine Y, Cohen-Hadar N, Freeman A, Frolow F. (2007). Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 711-718.

Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. (2005). Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 764-774.

Ye ZY, Lu YG, Sun H, Cheng XP, Xu TL, Zhou JN. (2008). Fluoxetine inhibition of glycine receptor activity in rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1239: 77-84.

11. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. La unión de un fármaco a muchos blancos moleculares.....	8
Figura 2. Estructura química de la fluoxetina.....	10
Figura 3. Representación esquemática de una sinapsis monoaminérgica simplificada.....	12
Figura 4. Topología del transportador de 5-HT.....	14
Figura 5. Estructura química de la escopolamina.....	18
Figura 6. Procedimiento general para la búsqueda de proteínas blanco de ligandos marcados radiactivamente, utilizando el sistema de expresión de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con mRNA de cerebro de mamífero.....	33
Figura 7. Electroforesis de membranas totales extraídas de ovocitos no inyectados.....	34

Figura 8. Microscopía de fluorescencia para evaluar la expresión de P2X4-GFP en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	35
Figura 9. Western blot para P2X4-GFP.....	36
Figura 10. Corriente generada por 5-HT en ovocitos que expresan el SERT.....	37
Figura 11. SDS-PAGE al 8% teñido con nitrato de plata de muestras de marcaje de fotoafinidad con [³ H]-F	38
Figura 12. Marcaje de fotoafinidad con [³ H]-F. a) Gel impregnado con PPO. b) Autorradiograma después de la exposición del gel (5 días, -70 °C).	38
Figura 13. Marcaje de fotoafinidad con [³ H]-F. a) Gel impregnado con PPO. b) Autorradiograma mostrando la señal obtenida después de la exposición del gel durante 20 días a -70 °C.....	39
Figura 14. Densitometría de las bandas obtenidas en el autorradiograma del marcaje con [³ H]-F.....	40
Figura 15. Corriente generada por ACh en ovocitos que expresan M1.....	41
Figura 16. Marcaje de afinidad con [³ H]-NMS.....	42

12. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de muestras para el marcaje de fotoafinidad con [³ H]-F.....	30
Tabla 2. Preparación de muestras para el marcaje de afinidad con [³ H]-NMS.....	31