



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**“Evaluación del efecto de ivermectina (IVM) y
etanol sobre el receptor P₂X₄ de humano.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN
MAESTRO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA

IBQ. NAYBI NIKTE-HA REQUEJO MENDOZA

Durango, Dgo.

Agosto 2018.



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**“Evaluación del efecto de ivermectina (IVM) y etanol
sobre el receptor P_2X_4 de humano.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA

IBQ. NAYBI NIKTE-HA REQUEJO MENDOZA

APROBADA POR EL DIRECTOR DE TESIS

DC. MARIA GUADALUPE NIETO PESCADOR

Durango, Dgo.

Agosto 2018.



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**“Evaluación del efecto de ivermectina (IVM) y etanol
sobre el receptor P_2X_4 de humano.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRO EN
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA

IBQ. NAYBI NIKTE-HA REQUEJO MENDOZA

PROBADA POR EL CO-DIRECTOR DE TESIS

DC. CARLOS BARAJAS LÓPEZ

Durango, Dgo.

Agosto 2018.



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



“Evaluación del efecto de ivermectina (IVM) y etanol sobre el receptor P₂X₄ de humano.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA: IBQ. NAYBI NIKTE-HA REQUEJO MENDOZA

APROBADA POR EL COMITÉ TUTORAL

DC MARIA GUADALUPE NIETO PESCADOR
PRESIDENTE

DC EDUARDO LOZANO GUZMAN
SECRETARIO

DC ANGÉLICA MARÍA LÓPEZ RODRÍGUEZ
VOCAL

Durango, Dgo.

Agosto 2018.

DEDICATORIA

A mis padres Nely y Luis Ángel por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi formación, por su incondicional apoyo mantenido a través del tiempo, por impulsarme siempre a fijar metas y cumplirlas y por enseñarme a maravillarme y agradecer de las pequeñas y grandes cosas.

A mi esposo Anthon por su apoyo y amor incondicional siempre a cada paso.

A la vida por permitirme seguir cumpliendo sueños que se convierten en objetivos y metas de los cuales voy aprendiendo a cada paso con ímpetu.

AGRADECIMIENTOS



Agradezco al apoyo de PRODEP por la financiación otorgada a través del proyecto de investigación 511-6/17-7663 “EVALUACIÓN DE LA IVERMECTINA COMO FÁRMACO ANTIALCOHOLISMO”



Así mismo a CONACYT por la beca otorgada durante la realización de la maestría con No. Beca: 453666



Agradezco también al laboratorio de Neurobiología dentro del departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por su apoyo en la realización de los experimentos electrofisiológicos para la realización de ésta tesis.

A mis asesores, profesores y personal de apoyo en la realización y culminación de este trabajo de tesis.

A mi familia que siempre ha apoyado y vigilado cada uno de mis pasos.

A las personas en San Luis Potosí que hicieron posible la estancia académica.

A mis amigos y compañeros quienes, propiciaron que tiempo transcurrido durante la realización de ésta Maestría se colmara de momentos agradables.

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AMYG	Amígdala
ATP	Adenosin-Tri-Fosfato
AUC	Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas (siglas en inglés)
CBM	Cerebelo
C _{MAX}	Concentración plasmática máxima
EC ₅₀	Concentración Efectiva media
ETOH	Etanol
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (siglas en inglés Food and Drug Administration)
GP	Globo pálido
HP2X4R	Receptor P2X4 de humano
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria media
IVM	Ivermectina
LB	Luria Bertani
LH _{AB}	Habénula Lateral
MMN-3	Manipulador manual Narishigue-3
NA _{CC}	Núcleo de Accumbens
NMDA	N- Dimetil-Aspartato
OPS	Organización Panamericana de la Salud
P2X4R	Receptor P2X4
PFC	Córtex prefrontal
PPADS	Piridoxalfosfato-C-azofenil-2',4'-disulfónico
RP2X4	P2X4 de rata
SE	Error estándar
SN	Sustancia Nigra
SNC	Sistema Nervioso Central
T _{1/2}	Vida media
TEVC	Fijación de voltaje con dos electros (siglas en inglés)
T _{MAX}	Tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima
TMI	Transmembranal I
TMII	Transmembranal II
TUAS	Trastornos por el uso de alcohol
VTA	Área Tegmental Ventral

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ABREVIATURAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT.....	IX
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. El alcoholismo como problema de salud.	10
1.2. Mecanismos moleculares de la generación de dependencia al alcohol.	13
1.3. Fármacos utilizados para el tratamiento de los trastornos por el uso del alcohol.	15
1.4. La Ivermectina como fármaco potencial para el tratamiento de los desórdenes por el uso del alcohol.	18
1.5. Receptores ionotrópicos P2X.....	20
1.6. Expresión y rol fisiológico de los receptores P2X4 en el cuerpo humano	23
1.7. Sistema de expresión heteróloga en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	25
II. ANTECEDENTES	27
III. JUSTIFICACION.....	29
IV. HIPOTESIS.....	30
V. OBJETIVOS.....	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivo específicos.....	31
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1. DNA plasmídico	32
6.1.1 Recuperación de DNA.....	32
6.1.2 Propagación del plásmido y verificación de la presencia y secuencia del P2X4R de humano	33
6.1.2.1 Preparación de bacterias	33
6.1.2.2. Transformación de PCDNA3.1-hP2X4	34
6.1.3. Extracción del DNA Plasmídico.	34
6.1.4. Digestión Enzimática	35

6.1.5.	Secuenciación	35
6.2.	Expresión del receptor P2X4 de humano en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	36
6.2.1.	Preparación del DNA plasmídico	36
6.3.	Transcripción <i>In vitro</i>	36
6.3.1.	Obtención de Ovocitos	37
6.3.2.	Inyección de RNA.....	37
6.3.3.	Registros Electrofisiológicos	37
6.3.3.1.	Análisis de Datos.....	38
VII.	RESULTADOS	39
7.1.	Verificación del P2X4R de humano	39
7.2.	Transcripción <i>In vitro</i>	40
7.3.	Expresión del receptor P2X4 de humano en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	41
7.4.	Registros Electrofisiológicos.....	42
VIII.	DISCUSIÓN.....	46
IX.	CONCLUSIONES	48
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Topología Estructural de los receptores P2X	21
Figura 2. Registros de corriente característicos de los receptores P2X (1-7) homoméricos	22
Figura 3. Principales conexiones dentro del sistema de aversión y recompensa	25
Figura 4. Mapa del vector PCDNA3.1	32
Figura 5. DNA Plasmídico	39
Figura 6. Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	41
Figura 7. Respuestas generadas por la aplicación de ATP sobre hP2X4R	42
Figura 8. El etanol tiene un efecto inhibitorio sobre el hP2X4R de humano expresado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	43
Figura 9. La Ivermectina potencia las corrientes inducidas por ATP en el hP2X4R expresado en ovocitos de rana <i>Xenopus laevis</i>	44
Figura 10. Registros control en ovocitos de rana de la especie <i>Xenopus laevis</i> ...	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentraciones Intoxicantes de EtOH.....	12
Tabla 2 Fármacos utilizados en el tratamiento de la dependencia alcohólica.....	17
Tabla 3 Cepas bacterianas empleadas en el estudio	33
Tabla 4 Alineamiento del resultado de la secuenciación con las secuencias de humano de la base de datos del NCBI.....	40
Tabla 5 Medición de concentración de RNA por Nanodrop	40

RESUMEN

Se sabe que la ingesta de alcohol produce diversos efectos negativos para la salud en diferentes formas, resaltando las lesiones de órganos y tejidos.

Evidencia farmacológica y preclínica en modelos murinos muestra que la Ivermectina (IVM) produce un efecto de disminución en el consumo de alcohol, por lo que se ha propuesto como un fármaco potencial para el tratamiento de los Trastornos por el Uso de Alcohol (TUAs). La IVM es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de enfermedades parasitarias; sin embargo, fuera de su efecto antiparasitario, la IVM es un modulador positivo y altamente selectivo del receptor purinérgico P2X4 (P2X4R), además, contrarresta los efectos inhibitorios que el etanol tiene sobre dicho receptor. Dentro de la familia de los receptores P2X, el P2X4R es el que se encuentra más ampliamente expresado en el Sistema Nervioso Central (SNC) y presenta la mayor sensibilidad al etanol (EtOH) y al estar presente en las neuronas que conforman el sistema de aversión y recompensa, se cree que juega un papel importante en la regulación de dicho sistema y por lo tanto en la generación de la dependencia al alcohol.

Sin embargo, al momento no existe trabajo reportado sobre la caracterización farmacológica de los efectos de ivermectina y etanol sobre el receptor P2X4 de humano; mientras que existe evidencia de respuestas farmacológicas diferentes frente a un mismo fármaco, entre ortólogos del P2X4R.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos farmacológicos del EtOH y la IVM sobre el P2X4R de humano mediante la técnica electrofisiológica de Fijación de Voltaje con dos electrodos (TEVC); usando como sistema de expresión heteróloga, los ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*. Nuestros resultados sugieren que la IVM presenta una acción neutralizante de los efectos del EtOH sobre el canal P2X4R de humano, así mismo es de destacar que los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo de tesis, difieren de lo reportados hasta el momento, siendo las EC50 para ATP e IVM mayores y la IC50 para EtOH menores que las reportadas sobre P2X4R de rata, por lo que el gusto por el alcohol en humanos pudiera verse disminuido.

ABSTRACT

Alcohol intake can induce diverse negative health effects, affecting organs and tissues (OPS, 2015b).

Pharmacological and preclinical studies using murine models have demonstrated that IVM has a diminishing effect on alcohol consumption, suggesting it as a potential therapeutic drug for alcohol use disorders treatment. IVM is an approved drug by the FDA for the treatment of parasitic diseases; however, outside its antiparasitic effect, IVM is a positive and highly selective modulator of the P2X4 purinergic receptor, besides it counteracts the inhibitory effects that ethanol has on the said receptor. Within the family of P2X receptors, P2X4R is the most widely expressed in the Central Nervous System (CNS) and has the highest sensitivity to ethanol (EtOH), in addition, it is present in the neurons that make up the aversion system and reward, so it is believed that plays an important role in the regulation of this system and therefore in the generation of alcohol dependence.

However, at the moment there is no reported work of the pharmacological characterization of IVM and EtOH effects on human P2X4 receptor; while there is evidence of the different pharmacological responses to the same drug, between orthologues of P2X4R.

The aim of this work was to evaluate the pharmacological effects of EtOH and IVM on the human P2X4 receptor, the heterologous expression system commonly used for ion channels, the frog oocytes of the *Xenopus laevis* specie. Our results suggest that IVM has a neutralizing action on the EtOH effects on the P2X4R channel, so that, the like for alcohol could be diminished.

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE IVERMECTINA (IVM) Y ETANOL SOBRE EL RECEPTOR P2X4 DE HUMANO.”

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El alcoholismo como problema de salud.

El término alcoholismo hace referencia a las consecuencias físicas de la ingesta continua y arraigada de bebidas alcohólicas, acción caracterizada por la falta de control sobre el consumo de las mismas.

Las bebidas alcohólicas son aquéllas que contienen diferentes niveles de etanol y están destinadas para el consumo humano. Generalmente son preparadas por medio de fermentación y/o destilación (Babor et al., 1994). Es importante señalar que el consumo de éstas bebidas resulta altamente perjudicial para los consumidores y las personas que les rodean, siendo los trastornos por el uso del alcohol y sus variantes la cuarta causa de muerte en México (OPS, 2015b).

La ingesta de alcohol produce diversos efectos negativos para la salud, pudiéndose resaltar las lesiones de órganos y tejidos, la incitación a conductas peligrosas durante la fase de intoxicación etílica y el desarrollo de trastornos por consumo del alcohol (OPS, 2015b).

De acuerdo a la X revisión de la clasificación estadística Internacional de las enfermedades y problemas relacionados con la salud, existen más de 60 afecciones provocadas exclusivamente por la ingesta de alcohol y más de 200 en las que el alcohol está relacionado negativamente (OPS, 2015a).

La exposición crónica al alcohol produce diversos efectos fisiológicos que se listan en la Tabla 1, donde se describe la gradualidad con la que el EtOH afecta el comportamiento y las capacidades físicas de la persona, siendo los más leves:

euforia suave, relajación, alegría, locuacidad, disminución de la inhibición y disminución de la concentración y los más severos: alto riesgo de intoxicación y posibilidad de muerte.

Tabla 1 Concentraciones Intoxicantes de EtOH.

gr / L	MOLARIDAD (mM)	Comportamiento	Discapacidad
0,10 a 0,29	2.2 a 6.3	El individuo promedio se ve normal	Con exámenes especiales se pueden detectar algunos efectos sutiles
0,30 a 0,59	6.4 a 12.9	Euforia suave, relajación, alegría, locuacidad, disminución de la inhibición	Concentración
0,60 a 0,99	13.0 a 21.5	Sentimientos mitigados, desinhibición, extroversión	Razonamiento, percepción profunda, visión periférica, recuperación de la vista después del deslumbramiento
1,00 a 1,99	21.6 a 43.2	Exceso de expresión, vaivenes emocionales, enojo o tristeza, bullicio, disminución de la libido.	Reflejos, aumento del tiempo de reacción, motricidad fina, tambaleo, titubeo, dificultad para hablar, disfunción eréctil temporal, posibilidad de intoxicación temporal.
2,00 a 2,99	43.3 a 64.9	Estupor, pérdida de la comprensión, deterioro de sensaciones, posibilidad de caer inconsciente	Deficiencia motora grave, pérdida de la conciencia, amnesia
3,00 a 3,99	65.0 a 86.6	Depresión grave del sistema nervioso central, pérdida del conocimiento, posibilidad de muerte	Funcionamiento de la vejiga, hipoventilación, desequilibrio, bradicardia (disminución de la frecuencia cardíaca).
4,00 a 4,99	86.7 a 108.3	Falta general de comportamiento, pérdida del conocimiento, posibilidad de muerte	Respiración, frecuencia cardíaca, nistagmo (movimiento involuntario e incontrolable de los ojos) posicional debido al alcohol
5,00 o más	108.4 o más	Alto riesgo de intoxicación, posibilidad de muerte	

Modificado de: (Salazar & Antuñano, 2005)

1.2. Mecanismos moleculares de la generación de dependencia al alcohol.

La generación de la dependencia al alcohol es un proceso complejo que se da por la asociación de un conjunto de factores fisiológicos, genéticos, ambientales y sociales.

Antes de la ingesta de alcohol, el cerebro se encuentra en un estado de equilibrio u homeostasis fisiológica. En el proceso por mantener una homeostasis permanente en el organismo, múltiples sistemas fisiológicos tratan de compensar los cambios inducidos por las sustancias adictivas. Con la ingesta crónica, se producen cambios en neurotransmisores y en el número de receptores con el fin de conseguir una neuroadaptación o una nueva homeostasis (Brady et al., 2006). Los sistemas glutamatérgicos, gabaérgicos y dopaminérgicos, así como los opiáceos y de serotonina, presentan cambios ante el nuevo estado para mantener sus efectos de recompensa debido a la estimulación que se lleva a cabo sobre múltiples receptores por acción del EtOH (Lukas et al., 1999). Dichos cambios suceden principalmente en el NAcc, lo que ha llevado a que éste sea definido como el centro de recompensa para el alcohol y otras drogas (Deitrich et al., 1989).

Al ser GABA el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, el alcohol estimula al complejo de estos receptores incrementando su efecto inhibitorio y produciendo en el individuo una relajación inicial seguida de intoxicación y anestesia. Con la exposición crónica, el número de receptores gabaérgicos presentes en la membrana celular disminuye (receptores a la baja), en particular la subunidad alfa 1 (Brunton et al., 2012) con el fin de tratar de compensar los efectos del alcohol sobre el SNC, lo que conduce al fenómeno denominado *tolerancia*.

Diversos estudios han demostrado la producción, por parte de las neuronas, de nuevas moléculas de tipo GABA_A que responden con menor intensidad a la presencia del alcohol, lo que en forma conjunta refuerza los mecanismos de adaptación (Brady et al., 2006).

Durante la fase de abstinencia, estos mecanismos de reorganización en los receptores GABA_A sufren alteraciones que producen aumento en el número y efectividad del GABA (regulación a la alta) y cambios en la función del receptor, con la consecuente generación de síntomas derivados de este sistema (Brady et al., 2006).

En contraste, y de manera opuesta al GABA, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC. Su efecto se produce a través de varios tipos de receptores glutamatérgicos, principalmente de tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA), que parece ser el más sensible al alcohol. Al inhibirse los receptores NMDA por acción del EtOH, la respuesta del cerebro es incrementar el número de receptores de este tipo (regulación al alta) mediante la expresión génica ejercida en el núcleo neuronal. Sin embargo, en las personas con TUAs estos receptores se adaptan y responden en menor proporción durante los periodos de ingesta. Durante la abstinencia, el incremento de receptores NMDA se traduce en: crisis convulsivas, alucinaciones, temblor, hiperactividad simpática, hipertensión, confusión y/o disforia (Brady et al., 2006).

La activación celular a través de la estimulación de los receptores antes mencionados, abre otros canales denominados ionotrópicos, como es el caso del canal P2X₄R, permitiendo el paso de iones (Ca⁺, Na⁺, K⁺, etc.), incrementando la liberación del neurotransmisor correspondiente a los receptores estimulados. En altas dosis, el alcohol ejerce efectos inhibitorios en los canales de sodio y calcio dependientes del voltaje, reduciendo la entrada del último a la célula, lo que puede contribuir a la depresión respiratoria y al coma, cuando los niveles de alcohol son elevados (Nestler, 2004).

Al activarse otro tipo de receptores, conocidos como metabotrópicos, se desencadena la activación del segundo mensajero (AMPC) y proteína quinasa A (PKA) lo que inicia cambios, algunas veces perdurables, en la expresión génica de la célula, incluyendo a los mismos receptores. La activación de éstos ocurre principalmente en el NAcc y en el VTA, lo que provoca activación y liberación de dopamina y se traduce como efecto de recompensa.

Paralelamente, también hay cambios en otros tipos de neurotransmisores y receptores que se activan durante la ingesta de alcohol. La activación específica de receptores de serotonina influye en el consumo de alcohol, en el síndrome de abstinencia y en la liberación de la dopamina. Por otro lado, se sabe que la estimulación de receptores de opioides endógenos, principalmente en vías del NAcc, contribuye al refuerzo del consumo de alcohol, probablemente por su interacción con la liberación de dopamina y el efecto placentero que produce.

1.3. Fármacos utilizados para el tratamiento de los trastornos por el uso del alcohol.

Los sistemas opiodérgico, dopaminérgico, mesolímbico y algunos componentes del sistema glutamatérgico y gabaérgico se han considerado desde hace tiempo como blancos en el uso y desarrollo de fármacos para el tratamiento de la dependencia al alcohol. (European Medicines Agency, 2010)

Hoy en día existen algunos medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (siglas en inglés Food and Drug Administration FDA) para el tratamiento de trastornos en el uso del alcohol, los cuales se concentran en disuadir de la ingesta de alcohol, mediante el bloqueo del metabolismo del mismo o afectando directamente a los sistemas neuroquímicos en la cascada de señalización que conlleva a la ansiedad o la dependencia (Ver tabla 2) (Davies et al., 2013; Johnson et al., 2007; Maccioni et al., 2010; Steensland et al., 2007), todos con el fin de mantener a los pacientes dependientes del alcohol en abstinencia estable, previniendo recaídas después de la desintoxicación (European Medicines Agency, 2012).

De acuerdo a sus blancos terapéuticos los medicamentos para el tratamiento de los desórdenes en el consumo de alcohol se clasifican como:

- Inhibidores de la metabolización del acetaldehído (metabolito intermediario en la ruta de conversión del alcohol a acetato), antidipsotrópicos o interdictores.
- Reductores del efecto asociado al consumo de alcohol, bloqueo opiodérgico y de receptores dopaminérgicos.
- Atenuadores de la sintomatología de la abstinencia
- Potenciadores de la capacidad de control, serotoninérgicos y antipsicóticos.
- Atenuadores del estado depresivo que puede anteceder a la recaída.

(Ponce et al., 2003)

De acuerdo a Williams (2005) los mejores fármacos para prevenir la recaída de pacientes alcohólico dependientes eran Acamprosato y Naltrexona aunados a programas psicológicos, sin embargo, se remarcó también la necesidad de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de este desorden, debido a las reacciones adversas presentadas por los medicamentos usados, considerando la necesidad de la frecuente dosificación por periodos prolongados para lograr un tratamiento exitoso contra la dependencia alcohólica. Esto ha llevado a diversos grupos de investigación a trabajar en diferentes blancos terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de los TUAs. Dentro de dichas investigaciones resaltan:

- La modulación de los receptores GABA_A como interferencia y modificación de las acciones relacionadas con la dependencia alcohólica (Joshi et al., 2012).
- El uso del factor neurotrófico derivado de la glía como blanco terapéutico o modulador del sistema de recompensa, ya que éste ha demostrado suprimir la necesidad y recaída del consumo de alcohol, por medio de la normalización de las alteraciones inducidas en la transmisión de dopamina (Barak et al., 2011).
- La modulación de los receptores P2X₄, mediante el fármaco IVM, sugiriendo a éste fármaco como posible medicamento para reducir la dependencia al consumo de alcohol (Howard et al., 2011).

Tabla 2 Fármacos utilizados en el tratamiento de la dependencia alcohólica.

Fármaco	Mecanismo de acción	Tratamiento	Aprobado FDA	Dosis	Efecto clínico	Efectos Adversos	Contraindicaciones
<i>Acamprosato</i>	Bloqueo de neurotransmisores, glutamato	Antagonismo del receptor NMDA	Si	De 2 a 3 tabletas (333mg) por día	Disminuye el deseo de beber y los efectos Neurotransmisores	Diarrea, dolor de cabeza, flatulencias, náusea, vómito, dispepsia	Insuficiencia renal grave
<i>Disulfiram</i>	Producción de metabolitos en su proceso de degradación. Acetaldehído	Inhibidor de aldehído-deshidrogenasa	Si	250mg/día a 500 mg/día	Aversivo	Palpitaciones, sonrojo, náusea, vómito, dolor de cabeza	Alcohol, Metronidazol o paraldehído, psicosis, enfermedad cardiovascular
<i>Fluoxetina</i>	Disminuye la función serotoninérgica	Inhibidores de la recaptación de serotonina	No	20mg/día a 60mg/día	Disminuye la sintomatología depresiva y ansiosa. También disminuye la ingesta etílica durante las primeras semanas	Náusea, dolor de cabeza, ansiedad, disfunción sexual, sedación	Uso de IMAO, mesoridazine o tioridazina
<i>Nalmefene</i>	Agonista de endorfinas	Antagonista opiáceo	No	Disponible solo en forma inyectable para tratamiento de sobredosis opiácea	Disminución de efectos reforzantes del alcohol y el deseo de consumir	Náusea, taquicardia, vasodilatación, jaqueca, dolor de cabeza, mareo, vómito	---
<i>Naltrexona</i>	Agonista de endorfinas	Antagonista opiáceo	Sí	50 mg/ día	Disminución de efectos reforzantes del alcohol y el deseo de consumir	Náusea, dolor de cabeza, ansiedad, sedación	Uso narcótico, falla hepática
<i>Ondansetron</i>	Disminuye la función serotoninérgica	Inhibidores de la recaptación de serotonina	No	4mg/kg dos veces al día	Disminuye la sintomatología depresiva y ansiosa. También disminuye la ingesta etílica durante las primeras semanas	Fatiga dolor de cabeza, mareo, ansiedad	---
<i>Tiaprida</i>	Disminuye la función dopaminérgica	Tiapride	No	300 a 400 mg/día, durante 1-2 meses	Disminuye los efectos reforzantes del alcohol y la ansiedad	Mareo/vértigo, cefalea, somnolencia, insomnio, agitación, indiferencia, hiperprolactinemia, astenia/fatiga	Antecedentes de epilepsia, ancianos, niños, pacientes con factores de riesgo de embolia cerebral. Riesgo de arritmias ventriculares graves

(Hargreaves WA, 2005; Ponce et al., 2003; Vademecum Vidal, 2015; Williams, 2005)

1.4. La Ivermectina como fármaco potencial para el tratamiento de los desórdenes por el uso del alcohol.

La IVM es un fármaco semisintético aprobado por la FDA como antiparasitario de amplio espectro. Tiene una estructura de lactona macrocíclica que es comúnmente utilizada para tratar estrogiloidiasis y oncocercosis (Enciclopedia Médica A.D.A.M., 2016).

Cuenta con una farmacocinética caracterizada por el aumento de la concentración plasmática de manera proporcional al incrementar la dosis. Con $C_{max} = 260.5$ [ng/ml], $t_{max} = 4.6$ [h] y $t_{1/2} = 15$ [h]. Se metaboliza en el organismo humano y es eliminada con sus metabolitos casi exclusivamente por las heces después de 12 horas, excretando un 1% vía orina y sus metabolitos son excretados por tres días aproximadamente (Laboratorio Elea S.A.C.I.F. y A., 2010).

Se ha comercializado en el mercado veterinario durante más de 35 años y por más de 30 años de uso en humanos. Inicialmente fue introducida en la medicina humana en 1985 por Merck Group como tratamiento para prevenir el desarrollo de síntomas de infección con *Onchocerca volvulus* dentro del programa de donación a África y Sudamérica para el control de filariasis linfática. Su uso ha revolucionado el tratamiento de nematodos, artrópodos y parásitos en animales; proporcionando esperanza para el control e incluso la erradicación de filarias en los seres humanos. Sin embargo se ha descubierto que su uso no se limita al tratamiento de las enfermedades parasitarias. (Geary, 2005)

Con respecto a su seguridad, Guzzo y cols. (2002) realizó un estudio doble ciego, controlado con placebo y escalado de dosis, evaluando 68 sujetos asignados a uno de cuatro paneles (3: 1, ivermectina / placebo): 30 o 60 mg (tres veces a la semana) o 90 o 120 mg (dosis única). El panel de 30 mg (rango: 347-594 $\mu\text{g} / \text{kg}$) también recibió una sola dosis con alimentos después de un lavado de 1 semana. Después de dosis únicas de 30 a 120 mg, el AUC y la C_{Max} fueron generalmente proporcionales a la dosis, siendo $AUC_{(30\text{mg})} = 1892.5 \frac{\text{ng}\cdot\text{h}}{\text{mL}}$, $AUC_{(120\text{mg})} = 2402.9 \frac{\text{ng}\cdot\text{h}}{\text{mL}}$,

$C_{Max (30mg)} = 260.5 \frac{ng}{mL}$ y $C_{Max (120mg)} = 247.8 \frac{ng}{mL}$, con $t_{Max} \sim 4$ horas y $t_{1/2} \sim 18$ horas. La media geométrica de AUC de 30mg de IVM fue 2.6 veces mayor cuando se administró con alimentos. Las proporciones medias geométricas de AUC (día 7 / día 1) fueron de 1,24 y 1,40 para las dosis de 30 y 60 mg, respectivamente, lo que indica que la acumulación de ivermectina administrada cada cuarto día es mínima. Demostrando que la IVM se tolera bien a dosis más altas y regímenes más frecuentes (Guzzo et al., 2002).

1.5. Receptores ionotrópicos P2X

La familia de receptores P2X está conformada por un grupo de canales que son activados por Adenosin tri-fosfato (ATP) extracelular y cuya estructura molecular consiste de un trímero de subunidades proteicas que conforman canales homoméricos (de subunidades iguales) o heteroméricos (de subunidades diferentes). A la fecha se han identificado siete subunidades diferentes que han sido nombradas P2X1, P2X2, P2X3,... hasta la P2X7. Estas subunidades tienen una topología estructural que consiste de dos regiones hidrofóbicas (TMI y TMII); un “loop” extracelular con 10 cisteínas conservadas que a su vez forman puentes disulfuro y le confieren la forma de asa y los extremos NH₂ y COOH terminales de la proteína, que tienen ubicación intracelular. Con base a la evidencia experimental y estructural, se ha identificado al segmento TM1 como responsable del “*gating*” o apertura del canal y al TM2 como formador del poro por donde pasan los iones, ambos segmentos son de naturaleza hidrofóbica y se encuentran separados por el asa extracelular, la cual es la parte más grande del polipéptido (280 aminoácidos aproximadamente), además de estar involucrada en la unión del canal con el ATP. De los extremos, es en la región del carboxilo en la que se encuentran más diferencias entre los genes parálogos. Además poseen una secuencia conservada en la familia de receptores P2X, YXXXK (siendo X cualquier aminoácido) que se encuentra en el carboxilo terminal y está involucra con la retención del canal en la membrana celular (Fig. 1) (Baljit Khakh & North, 2006).

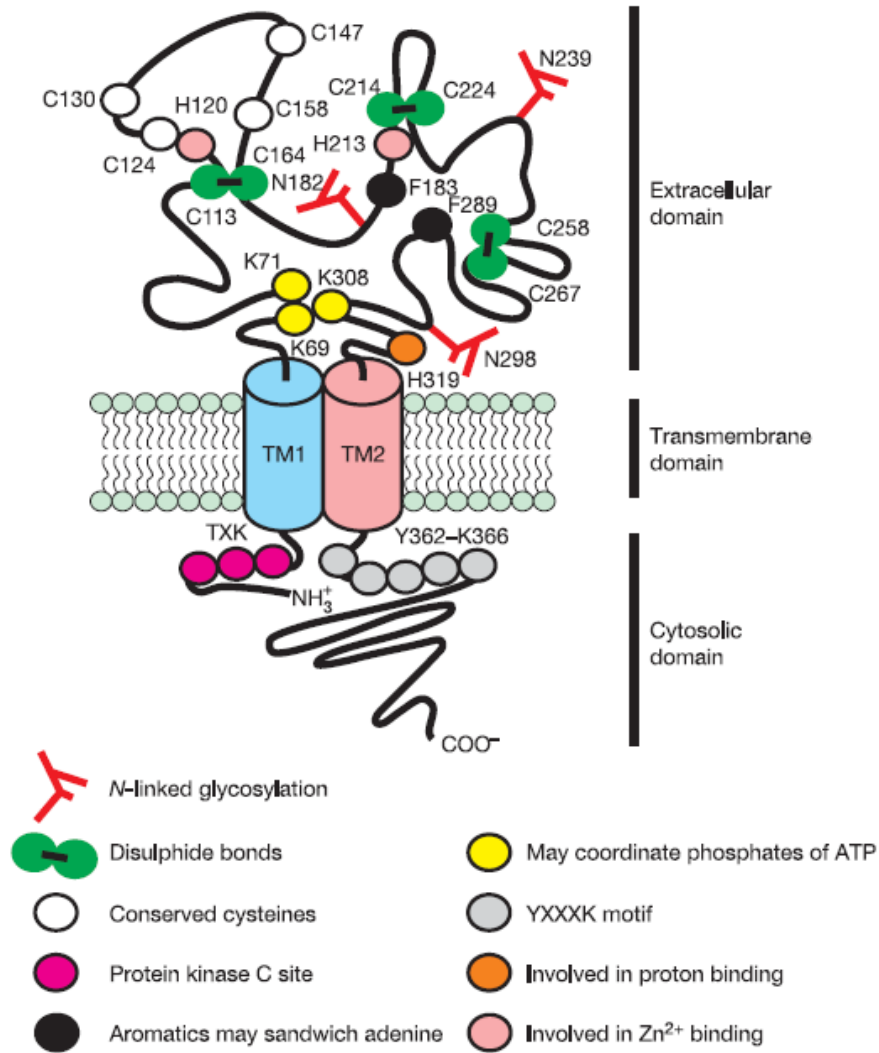


Figura 1. Topología Estructural de los receptores P2X

Esquema basado en estudios realizados a los receptores P2X1 y P2X2 mostrando la topología y características clave de sus subunidades. Los dominios transmembranales (TMI y TMII) representados por los cilindros azul y rosa, el asa extracelular con las cisteínas conservadas representadas por círculos blancos, los grupos amino y carboxilo terminales (ambos intracelulares) y en círculos de diferentes colores los residuos clave involucrados en diferentes procesos de la fisiología del canal. Los números de posición de los aminoácidos corresponden al P2X2 de rata. (Baljit Khakh & North, 2006).

Cada receptor de la familia P2X tiene una sensibilidad específica al ATP, comportamiento biofísico (activación, desensibilización, desactivación) y farmacología característica, además los receptores P2X al presentar una conformación homomérica o heteromérica también presentan diferentes propiedades biofísicas y farmacológicas que varían incluso entre especies. Como se puede ver en la figura 2, cada receptor P2X muestra diferente registro de corriente utilizando la técnica de Patch Clamp de célula completa. En esta técnica se fija la diferencia de potencial de la membrana de la célula que expresa los receptores P2X, para posteriormente medir la intensidad de las corrientes representadas gráficamente por registros electrofisiológicos que se generan tras la aplicación del agonista, en este caso, ATP. Uno de los componentes que se observa en la figura es una línea negra horizontal, que corresponde al tiempo de aplicación del agonista, en este caso ATP 30 μM , excepto 1 mM para P2X7 (se activa a concentraciones más altas de ATP). También se observa una línea vertical que corresponde a la entrada de iones (Ca^+ , Na^+ , K^+) del espacio extracelular al intracelular o corriente entrante de diferentes magnitudes dependiendo del canal que se trate. En seguida algunos canales se desensibilizan, lo que quiere decir que a pesar de la presencia del agonista ya no se abre más o incluso empiezan a cerrarse por lo que se observa un regreso de la línea vertical hacia arriba de forma curva y por último el cierre del canal tras el lavado del agonista produce la caída de la corriente representada por la línea vertical de regreso a la corriente basal (North, 2002).

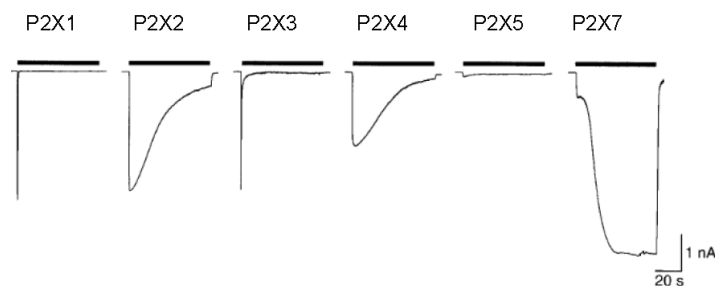


Figura 2. Registros de corriente característicos de los receptores P2X (1-7) homoméricos

Registros de patch clamp en célula completa de las corrientes inducidas por ATP 30 μM , excepto 1 mM para P2X7, en celular HEK293 transfectadas con las subunidades P2X de la rata (La subunidad P2X6 no forma canales homoméricos).

1.6. Expresión y rol fisiológico de los receptores P2X4 en el cuerpo humano

El receptor P2X4, tiene una sensibilidad al ATP que se considera intermedia con respecto a los demás receptores de la familia P2X y un tiempo de activación rápido con caída de corriente lenta (Fig. 2), que es controlada por aminoácidos de su región C-terminal (Young et al., 2008). No presenta sensibilidad a cambios de pH y posee propiedades farmacológicas distintivas como lo es la baja sensibilidad a los antagonistas purinérgicos suramina y Piridoxalfosfato-C-azofenil-2',4'-disulfónico (PPADS) (Concentración inhibitoria media ($IC_{50} > 100 \mu M$))(Buell et al., 1996; Soto et al., 1996) así como alta sensibilidad al EtOH, lo cual aunado a su expresión en el sistema nervioso central, le confiere un papel importante en la modulación de la señalización dentro del sistema de recompensa, para la generación de la dependencia al alcohol. (Bortolato et al., 2013; Khoja et al., 2016)

El receptor P2X4 presenta una amplia expresión en diferentes órganos y tejidos resaltando su expresión en los sistemas nervioso central y periférico, en el epitelio de las glándulas y vías respiratorias, en el músculo liso de la vejiga, el tracto gastrointestinal, el útero y las arterias, en el endometrio uterino y en las células adiposas (Bo et al., 2003) , generalmente se pueden encontrar en membrana citoplásmica y luminal en la mayoría de los tejidos, siendo muy abundante su expresión en trofoblastos placentarios, macrófagos pulmonares y mucosa gastrointestinal. (Babcock et al., 2003; Baxter et al., 2011; Shen et al., 2006; Solini et al., 2007)

Los receptores P2X4 destacan como objetivo potencialmente crítico en la regulación de la función cardíaca, la muerte celular mediada por ATP, el fortalecimiento sináptico y la activación del inflamósoma en respuesta a una lesión. (Kawano et al., 2012) La regulación de múltiples funciones nerviosas y conductuales, incluyendo el dolor, la regulación neuroendocrina y la plasticidad del hipocampo (Bortolato et al., 2013). Trabajos recientes demuestran el papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la dopamina, el control sensoriomotor, la interacción social y el

comportamiento relacionado al consumo de etanol, esto debido a la función de co-transmisión en la postsinápsis de la regulación del sistema de recompensa y la generación de la dependencia (Khoja et al., 2016).

De las rutas involucradas en el desarrollo y sostenimiento de la dependencia alcohólica, resalta la vía del sistema de recompensa, la cual forma parte del sistema nervioso central (SNC) y se conforma principalmente por las regiones del córtex prefrontal (PFC), núcleo de accumbens (NAcc), hipocampo y área tegmental ventral (VTA). El sistema de recompensa obedece a diferentes estímulos activando o inhibiendo la señalización entre las neuronas de las regiones involucradas, por medio de los neurotransmisores. Esta señalización le confiere al individuo el desarrollo de conductas en respuesta a sucesos agradables o de disgusto, debido a los cambios algunas veces perdurables, en la expresión de receptores y/o neurotransmisores, principalmente del NAcc y VTA, lo que provoca activación y liberación de dopamina que se traduce como efecto de recompensa. (Belssaso et al., 2002).

Dentro del SNC, cabe resaltar la expresión del receptor P2X4 en las regiones cerebrales de la vía de recompensa mesolímbica (VTA, NAc e hipocampo), dentro de estas regiones neuroanatómicas los receptores P2X4 se encuentran localizados en cuerpos neuronales o en la glía modulando la liberación de varios neurotransmisores, llevando a cabo la modulación de la señalización de los sistemas de neurotransmisores, ácido γ -amino butírico (GABA), glicina, dopamina, glutamato y acetilcolina nicotínica. Por lo anterior, se ha puesto a este receptor como un centro de atención en el estudio de blancos terapéuticos contra la dependencia al alcohol (Fig. 3) (Franklin et al., 2014; Tabakoff et al., 2009)

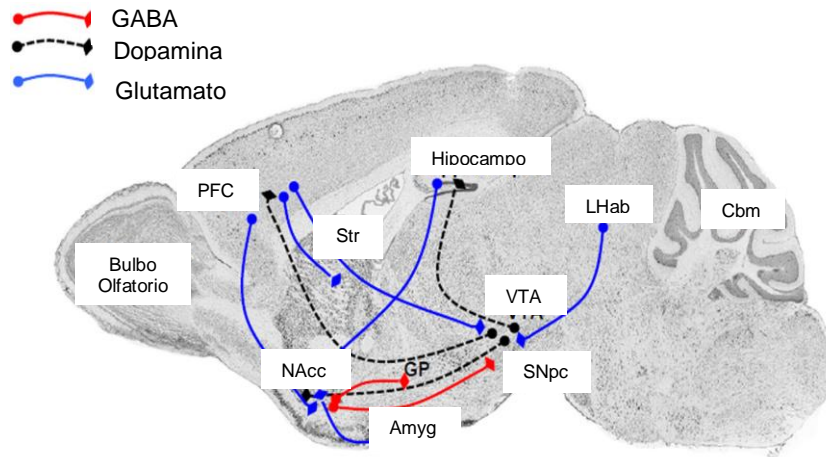


Figura 3. Principales conexiones dentro del sistema de aversión y recompensa

Los principales neurotransmisores y sus vías de acción son regulados directa o indirectamente por los receptores P2X4 debido a su expresión en las zonas clave dentro de dichas rutas. (Franklin et al., 2014).

1.7. Sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los canales iónicos dependientes de voltaje, son proteínas integrales de membrana a través de las cuales se da el transporte selectivo de iones en respuesta a cambios en el voltaje transmembrana. La identificación y caracterización de canales iónicos en diferentes sistemas celulares es una herramienta experimental ampliamente utilizada en estudios de neurobiología molecular, para lo cual destaca el uso del sistema de expresión heteróloga, ovocitos de rana sudafricana *Xenopus laevis*, los cuales se caracterizan por su capacidad para traducir eficientemente la información genética inyectada en su citoplasma y ensamblar e insertar canales iónicos en su membrana para generar respuestas electrofisiológicas (Soreq & Seidman, 1992). Esta técnica de expresión permite la caracterización de moléculas de difícil estudio en tejidos, ya que estas son expresadas por el ovocito con la actividad biológica característica de la molécula nativa (Chavez et al., 2003).

Una vez expresada la proteína en membrana, se utiliza para su estudio la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC). En esta técnica, una sola célula es empalada simultáneamente con dos micropipetas; una de ellas es usada para registrar el potencial de membrana, y la segunda se emplea para inyectar corriente con el objetivo de registrar la cantidad de corriente necesaria para mantener el potencial transmembrana en el voltaje deseado. Aunque en la práctica existe la posibilidad de cierta “comunicación cruzada” entre los electrodos, ésta resulta ser mínima y en principio, ambos electrodos son completamente independientes. Esta independencia garantiza una medición fidedigna del potencial de membrana por parte del electrodo de voltaje, simultáneamente una micropipeta inyectora de corriente con una punta de diámetro lo suficientemente grande, garantizará una fijación de voltaje segura y muy rápida (Chang & Slikker, 1995).

II. ANTECEDENTES

Dhulipala et al. (1988), reportaron la primera evidencia de la expresión de P2X4R de humano en el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*, inyectando 100 ng/ovocito de cRNA para la expresión de hP2X4R en membrana celular y obteniendo una Concentración efectiva media (EC_{50}) para ATP de 100 nM (Dhulipala et al., 1998).

Posteriormente Xiong et al. (2000) describieron el efecto inhibitorio del EtOH sobre los receptores P2X4 de rata expresado en ovocitos de rana del genero *Xenopus laevis*, encontrando que la amplitud de la corriente activada por 1 mM de ATP se redujo por la aplicación de EtOH de manera dependiente a la concentración en el intervalo de 1 ± 500 mM. Logrando una inhibición del 50% (IC_{50}) de corriente activada por 1 mM de ATP con 58 mM de EtOH. Así mismo pudieron ver como el EtOH 50 mM, desplazó la curva de concentración-respuesta de ATP a la derecha, aumentando la EC_{50} para ATP de 9.1 a 16.0 mM, sin reducir la respuesta máxima a ATP (Xiong et al., 2000).

Además, Davies et al. (2002) demostraron al P2X4R como la subunidad con mayor sensibilidad al etanol con respecto al resto de subunidades P2X.

Por otra parte, Khakh et al. (1999) comprobaron la modulación alostérica y positiva de IVM sobre el canal P2X4R de rata expresado en ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*. Estudio clave en la consideración actual de la IVM como potente fármaco agonista específico para los canales P2X4R (Khakh et al., 1999).

Complementando al estudio anterior, en el año 2004, Priel y Silberberg, reportaron el mismo efecto sobre el canal P2X4R de humano expresado en células HEK923 analizado mediante la técnica de fijación de voltaje de célula. Los datos obtenidos sugieren que la IVM aumenta la amplitud de las corrientes activadas por ATP, reduciendo la desensibilización del canal, a partir de la estabilización de una conformación abierta (Priel & Silberberg, 2004).

Los efectos de la IVM sobre el canal P2X4R pueden ser explicados gracias al trabajo de Jelinkova et al. de 2006, donde al experimentar con receptores quiméricos, identificaron residuos específicos del receptor, responsables de los efectos de la IVM en la activación del canal utilizando el P2X4R homomérico nativo de rata, P2X4R quiméricos y mutantes específicos de P2X4R de punto único en el ectodominio y dos dominios transmembrana. Revelando a la secuencia Val 64-Try315 del ectodominio como importantes en la modulación del canal por IVM. (Jelínková et al., 2006).

Los efectos descritos anteriormente de EtOH e IVM sobre el receptor P2X4 han sido expuestos por Asatryan, Popova y colaboradores (2010,2013), quienes reportan que dichos efectos son ejercidos a través de la unión de la IVM y EtOH a una cavidad de unión compartida por ciertos aminoácidos clave.

El primer modelo molecular de P2X4R de rata fue construido sobre la estructura cristalizada del P2X5 de pez cebra, revelando un sitio de unión tanto para EtOH como IVM, formado por Asp331 y Met336 en TM2 y Trp46 y Trp50 en el segmento TM1. Popova et al. Comprobaron que el Trp46 se comparte en los sitios de unión tanto para EtOH como para de IVM dentro del P2X4R, esto por medio de mutaciones a residuos con diferentes propiedades fisicoquímicas. Se probaron en respuestas a etanol e IVM usando el sistema de expresión heteróloga, ovocitos de *Xenopus laevis*. Lo cual aunado al trabajo reportado por Asatryan et al. (2010) donde el consumo de etanol fue mayor en ratones knock out P2X4R, sugiriendo que la cavidad de unión de EtOH e IVM en el receptor P2X4 formado por las posiciones 42, 46, 331 y 336 presentan un objetivo potencial para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de los TUAs (Asatryan et al., 2010; Popova et al., 2013).

III. JUSTIFICACION

La ingesta desmedida de alcohol produce diversos efectos negativos para la salud, acortando la expectativa de vida en más de una década (Schuckit, 2009). Existen más de 60 afecciones provocadas exclusivamente por la ingesta de alcohol y más de 200 en las que el alcohol está relacionado negativamente. Dentro de las cuales se encuentran algunas enfermedades crónico degenerativas como la polineuritis, el cáncer de faringe, laringe, hígado, colon, así como problemas vasculares y la hepatopatía alcohólica, la cuál es la enfermedad más comúnmente causada por el abuso en el consumo de alcohol (OPS, 2015a).

Actualmente existen diferentes fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de los desórdenes en el consumo del alcohol, sin embargo no son del todo eficaces y/o presentan diversos efectos adversos por lo que se continúa investigando en otros blancos terapéuticos.

Actualmente la evidencia farmacológica y de estudios preclínicos en modelos murinos proponen a la IVM como fármaco potencial para el tratamiento de los TUAs. Sin embargo, toda la evidencia que soporta lo anterior ha sido obtenida con el receptor P2X4 de rata y se ha encontrado que existen respuestas farmacológicas diferentes frente a un mismo fármaco entre ortólogos del P2X4R. Por lo que resulta primordial corroborar y caracterizar los efectos moduladores de IVM y EtOH sobre las corrientes inducidas por ATP en el P2X4R de humano.

IV. HIPOTESIS

Las corrientes inducidas por ATP en el receptor P2X4 de humano, son potenciadas por IVM e inhibidas por EtOH.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de IVM y EtOH sobre el receptor P2X4 de humano.

5.2 Objetivo específicos

1. Obtener cRNA funcional de hP2X4R.
2. Llevar a cabo registros electrofisiológicos para analizar las propiedades farmacológicas de IVM y EtOH sobre el hP2X4R.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. DNA plasmídico

El plásmido utilizado fue pCDNA-3.1 con el cDNA de hP2X4R clonado que fue donado por el grupo del Dr. Darryl Davies (USC, School of Pharmacy) (Fig. 5), y se recibió en el laboratorio embebido en papel filtro (Fig. 4)

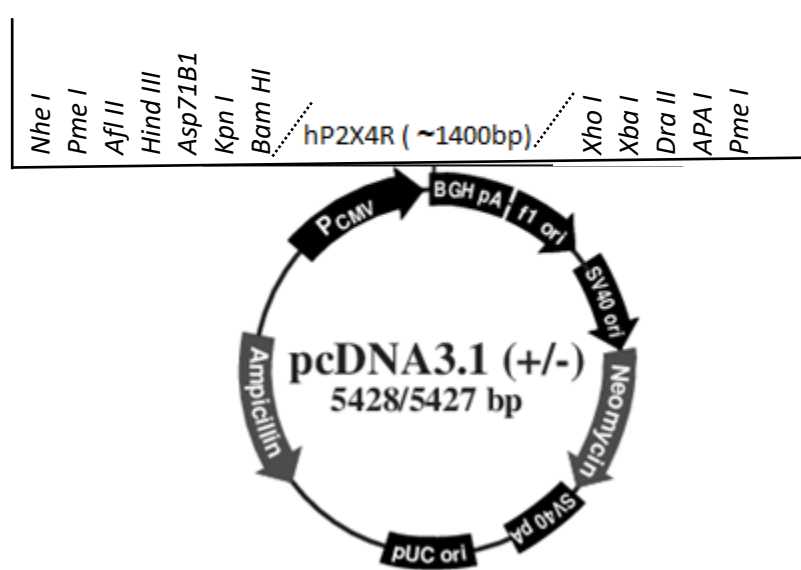


Figura 4. Mapa del vector PCDNA3.1

Plásmido conformado por 5428 pb, promotor CMV de 232 a 819, promotor T7 de 863 a 882, sitio de clonación de 895 a 1010 con gen de resistencia a neomicina de 2136 a 2930 y a ampicilina de 4432 a 5428.

6.1.1 Recuperación de DNA

Se recortaron los círculos marcados en el papel filtro, se colocaron en un tubo de 1.5 mL y se agregaron 50 µL de agua milliQ estéril por tubo. En seguida se llevaron a agitar por vórtex durante 2 minutos, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y por último se llevaron a almacenar a -20°C hasta su uso.

6.1.2 Propagación del plásmido y verificación de la presencia y secuencia del P2X4R de humano

Una vez recuperado el DNA plasmídico se procedió a su propagación con la técnica de transformación de células competentes.

6.1.2.1 Preparación de bacterias

Se tomó una colonia de células DH5 α (Tabla 3) para pre-inóculo de 3 mL de medio LB que se dejó crecer durante 12 horas a una temperatura de 37°C y una velocidad de agitación de 200rpm. En seguida se transfirieron 300 μ L del preinóculo en 23 mL de medio LB estéril y se incubó bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación hasta obtener el crecimiento bacteriano correspondiente a 0.5 de densidad óptica, medida a una longitud de onda de 550nm. En seguida el cultivo se colocó en hielo por 10 min para detener el crecimiento y posteriormente fue transferido a tubos de policarbonato fríos los cuales se centrifugaron a 4300 rpm y 4°C. A continuación la pastilla obtenida de la centrifugación, se decantó y resuspendió por golpeteo en 12 mL de CaCl frío y estéril. El resultado de la resuspensión fue incubado en hielo por 15 min y centrifugado a 4300 rpm y 4°C, para seguidamente decantar la pastilla obtenida y resuspender por golpeteo en 1.6mL de CaCl/glicerol al 50%. Finalmente se prepararon alícuotas de 50 μ L de volumen con la resuspensión previamente mencionada y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Tabla 3 Cepas bacterianas empleadas en el estudio

Cepa	Genotipo/fenotipo	Referencia
<i>E. coli DH5α</i>	F- Φ 80lacZ Δ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	(Sambrook & Russel, D, 2000)

6.1.2.2. Transformación de PCDNA3.1-hP2X4

Se utilizaron tres alícuotas de células calcio competentes para descongelar en hielo, posteriormente les fueron añadidos 6µL de PCDNA3.1 con hP2X4R clonado a la primera alícuota, 3 µL de PCDNA 3.1 circular (control positivo) a la segunda dejando la tercera alícuota sin adición de plásmido (control negativo). En seguida se incubaron en hielo por 30 min y a continuación en baño maría a 42°C por 45 seg para posteriormente regresarlas al hielo por un minuto y agregarles 250 µL de medio LB líquido a cada tubo e incubarlos a 37°C y 200 rpm durante 1.5 horas. Finalmente fueron centrifugados los tubos a 3500g por 5 min, para decantar y resuspender las pastillas obtenidas en 100 µL de medio LB, de los cuales se tomaron 50µL y plaquearon con varilla de vidrio en cajas de petri con medio LB sólido adicionado con ampicilina. Una vez realizado el plaqueo, se incubaron las cajas de petri por 12 h a 37°C.

6.1.3. Extracción del DNA Plasmídico.

Una vez realizado el procedimiento anteriormente descrito, fueron seleccionadas 5 colonias crecidas en caja de petri, para colocar cada una en 3mL de medio LB líquido adicionado con ampicilina e incubar a 37°C y 200 rpm durante 8 h, para proceder a la purificación del DNA plasmídico de acuerdo a la metodología, para preparación de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS, descrita por Sambrook (2000) y posteriormente corroborar la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 95V por 35 min (Sambrook & Russel, D, 2000).

6.1.4. Digestión Enzimática

Posterior a la extracción de DNA plasmídico, se prosiguió con una digestión enzimática para corroborar por tamaño, la presencia del inserto de hP2X4R (~1400pb). Dicha digestión se realizó con 0.2 μ L de XhoI, 0.4 μ L de BamHI, 2 μ L de buffer Tango 10X, 1 μ L de DNA plasmídico y 6.4 μ L de agua milliQ estéril. La reacción fue incubada a 37°C por 3 h y posteriormente se cargó en gel de agarosa al 1% para correr por 45 min a 95V. Las enzimas y buffers utilizados fueron de la casa comercial Thermo Fisher ®.

6.1.5. Secuenciación

Las muestras de DNA plasmídico coincidentes en tamaño, fueron disueltas a una concentración de 100ng/ μ L y se enviaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiental (LANBAMA), donde se utilizó el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), y secuenciador automatizado 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems), termociclador Verity para PCR punto final (Applied Biosystems), espectrofotómetro NANODRP 1000 (Thermo Scientific), concentrador centrífugo (Eppendorf), centrífuga (Hettich). Los resultados obtenidos fueron analizados por medio de la herramienta bioinformática *BLAST* desarrollada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés NCBI).

6.2. Expresión del receptor P2X4 de humano en ovocitos de *Xenopus laevis*.

6.2.1. Preparación del DNA plasmídico

Para linealizar el DNA plasmídico, fueron utilizados 2 μL de la enzima XhoI, 3 μL de Buffer, 1 μL de DNA plasmídico y 24 μL de agua milliQ estéril, una vez montada la reacción fue incubada a 37°C durante toda la noche; corroborando la digestión cargando 2 μL de la misma en gel de agarosa al 1% y corriendo por 45min a 95V. Al sobrante de la linealización fueron añadidos 2.5 μL de SDS al 20%, 0.75 μL de Proteinasa K con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 68.75 μL de agua milliQ estéril e incubando a 50°C por 30 min para posteriormente purificar por el método de fenol:cloroformo (Sambrook & Russel, D, 2000).

6.3. Transcripción *In vitro*

La reacción de transcripción *In vitro* del plásmido pcDNA3.1-hP2X4R fue realizada, de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit mMessage mMachine T7 ultra (Ambion, 2014), iniciando con la reacción de adición de caperuza, posteriormente la reacción de adición de la cola de adeninas y finalmente la precipitación de RNA sintetizado por el método de cloruro de litio.

Posteriormente se cuantificó por espectrofotometría el cRNA sintetizado, utilizando el equipo Nanodrop 1000®, en seguida el cRNA fue alicuotado en volúmenes de 2 μL a una concentración de 2.75 ng/ μL almacenándolos a -70°C hasta su uso.

6.3.1. Obtención de Ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron mediante disección de ranas de la especie *Xenopus laevis*. Para ello las ranas fueron anestesiadas mediante inmersión en solución de Tricaína 10mM (ácido etil éster 3-aminobenzoico). Los ovocitos en etapas de V y VI fueron desfoliculados manualmente y colocados en una solución de almacenamiento con pH de 7.3 a 7.4 ajustado con NaOH, conteniendo NaCl (96mM), CaCl₂ (1 mM), KCl (2 mM), HEPES (5 mM), Teofilina (0.6mM), Piruvato de Sodio (2.5 mM), suero fetal bovino (FBS) (1%), Penicilina (10,000 µ/L) y Estreptomicina (10 mg/Lt) y finalmente incubados a 16°C hasta su inyección.

6.3.2. Inyección de RNA

Para la expresión del hP2X4R en los ovocitos de *Xenopus laevis*, se inyectaron 36.2nL de cRNA en cada ovocito por medio del inyector nanolítrico de World Precisión Instruments mediante un micropipeta de vidrio (capilar de vidrio para nanolitrer 2010®, cat# 504949, 3.5 pulg de largo, Id=0.530mm±25µm, OD=1.14mm de World Precision Instruments) en el polo vegetal (lado amarillo) y se incubaron por un periodo de 42 a 60 h a 16°C, tiempo durante el cual se realizaban los registros electrofisiológicos.

6.3.3. Registros Electrofisiológicos

Las corrientes membranales de los ovocitos fueron registradas una vez transcurridas 36 h posteriores a la inyección de cRNA (teniendo como límite de tiempo un lapso de 12-36 h) por medio de la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos con un amplificador Axoclamp 2B (Molecular Devices). El registro de las corrientes se almacenó en el disco duro de una PC mediante el programa AXOSCOPE 9 (Molecular Devices) y se analizó utilizando el software AXOGRAPH 4.9 (Molecular devices).

Los electrodos de registro consistieron de pipetas de vidrio de 0.3-0.8 M Ω de resistencia, conteniendo una solución de KCl 2M con 10 mM de EGTA. Las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) se registraron a una fijación de voltaje de -60 mV y a temperatura ambiente (21-24°C).

Las soluciones de ATP se prepararon cada día de registro, manteniéndolas hielo para disminuir su degradación. Fueron aplicadas durante 10 s. Utilizando una cámara de registro perfundida de manera continua a velocidad de 3 mL/min con la solución externa que contenía NaCl (88 mM), KCl (2 mM), CaCl₂ (1 mM), MgCl₂ (1mM), HEPES (5 mM) a un pH de 7.2-7.4.

Para la perfusión de la solución externa, las soluciones de ATP y los fármacos de interés (EtOH e IVM) se utilizó un dispositivo de ocho tubos de 1.6 mm de diámetro. La aplicación de una u otras soluciones se realizó mediante el rápido intercambio de los tubos por medio de un manipulador manual Narishigue (MMN-3), colocando los tubos del dispositivo a una distancia de 1 mm frente al ovocito. Con un protocolo de 10 segundos de aplicación y 3 min de lavado para ATP y EtOH y 8 min de lavado para IVM.

6.3.3.1. Análisis de Datos

En cada ovocito se normalizaron las corrientes entrantes generadas por la aplicación de ATP, considerando la respuesta máxima como 100% en la curva de ATP y la respuesta generada por ATP 100 μ M para el caso de IVM y EtOH.

Los datos fueron expresados con SE, el número de células utilizadas para cada curva con n y las curvas concentración vs respuesta fueron ajustadas a una función logística sigmoidea, utilizando el software Graph Pad Prism 6.0.

VII. RESULTADOS

7.1. Verificación del P2X4R de humano

Una vez recuperado el DNA plasmídico del pcDNA3.1-hP2X4R del papel filtro, propagación y purificación, se procedió a verificar la presencia del inserto de cDNA de P2X4R de humano mediante la digestión con las enzimas XhoI y BamHI, las cuales flanqueaban el inserto de hP2X4R, dicha digestión fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1%, obteniéndose el tamaño esperado de aproximadamente 1,400 pb (Fig. 5).

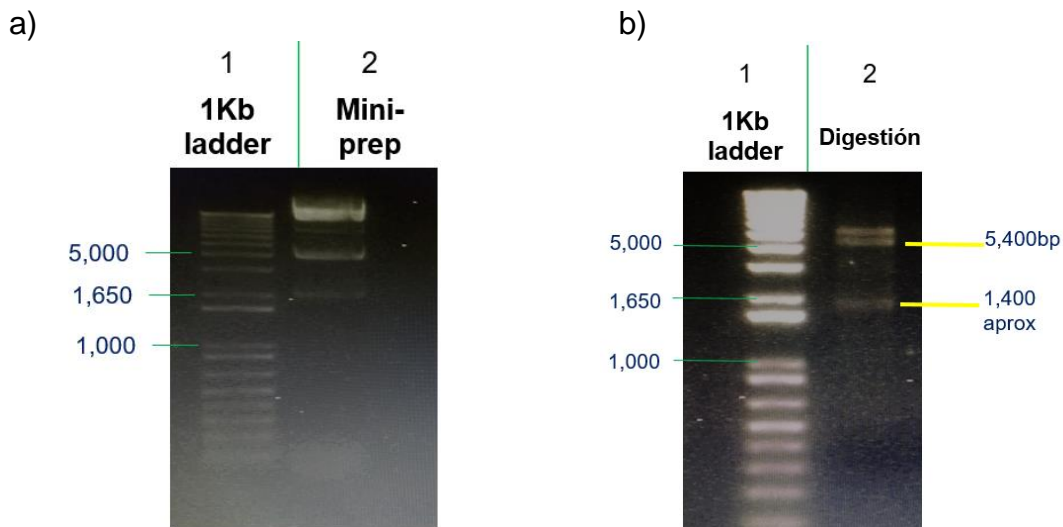


Figura 5. DNA Plasmídico

Verificación de tamaño del inserto del plásmido pcDNA3.1-hP2X4R. **a)** Corroboración de integridad de DNA plasmídico por electroforesis en gel de agarosa. **b)** Análisis de los fragmentos de la restricción del plásmido con las enzimas BamHI y XhoI donde se observan las bandas de tamaños esperados, aproximadamente 1400 pb para el fragmento correspondiente a hP2X4R y 5400 pb para el vector PCDNA3.1.

En seguida se analizaron los resultados obtenidos tras la secuenciación del inserto hP2X4R, obteniendo un 99% de identidad con las secuencias canónica (NM_001256796.1) y de algunas variantes (NM_002560.2, NM_001261398.1, NM_001261397.1) del receptor P2X4 de humano reportadas en la base de datos del NCBI (Tabla 4).

Tabla 4 Alineamiento del resultado de la secuenciación con las secuencias de humano de la base de datos del NCBI.

Descripción	Max score	Total score	Query cover	Ident	Número de acceso	
Homo sapiens purinergic receptor P2X 4 (P2RX4), transcript variant 2, mRNA	2119	2119	95%	0	99%	NM_002560.2
Homo sapiens purinergic receptor P2X 4 (P2RX4), transcript variant 1, mRNA	1953	2127	95%	0	99%	NM_001256796.1
Homo sapiens purinergic receptor P2X 4 (P2RX4), transcript variant 6, mRNA	1749	1749	78%	0	99%	NM_001261398.1
Homo sapiens purinergic receptor P2X 4 (P2RX4), transcript variant 5, mRNA	1242	1981	88%	0	99%	NM_001261397.1

7.2. Transcripción *In vitro*

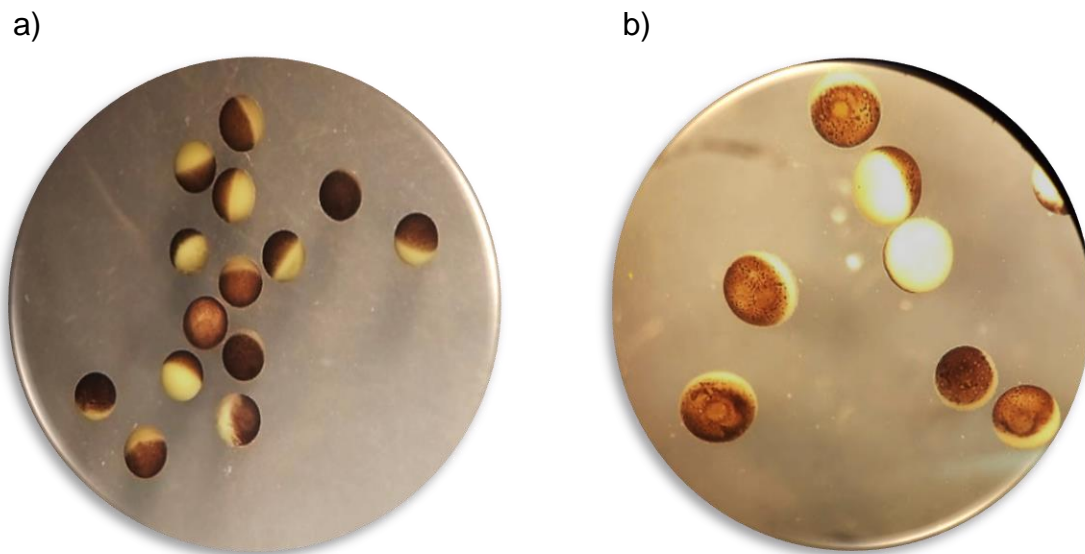
Se llevó a cabo la transcripción *In vitro* de acuerdo a la metodología descrita para posteriormente cuantificar el cRNA obteniendo los resultados de concentración e índices de pureza que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5 Medición de concentración de RNA por Nanodrop

ng/ μ L	260/280	260/230
1205.2	1.96	2.17
454.8	2.59	2.96
2093.7	1.97	2.53
1707.5	2.10	2.64
2388.7	2.24	2.46
4186.5	1.52	1.78
2979.8	1.93	2.2
3831	1.68	1.99

7.3. Expresión del receptor P2X4 de humano en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Para llevar a cabo la correcta expresión del receptor P2X4 de humano en ovocitos de la rana de la especie *Xenopus laevis*, se probaron diversos tiempos y temperaturas de incubación de los ovocitos, así como diferentes concentraciones de cRNA inyectado, resultando como mejores condiciones, la inyección de 0.1ng/ovocito de cRNA y el almacenamiento a 16°C de temperatura por 36 h de incubación. Resaltando la formación de vesículas endosómicas propias de la expresión en membrana del receptor P2X4, posterior a 36 h de incubación. Lo que de manera visual sirve como indicador para llevar a cabo los registros electrofisiológicos de las corrientes inducidas por ATP sobre los receptores P2X4 (Fig. 6).



Diametro de ovocito ~ 1-1.3mm

Figura 6. Ovocitos de *Xenopus laevis*

a) Controles de ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis* sin RNA inyectado tras 36 horas de incubación, vistos bajo objetivo 1X **b)** Ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis* inyectados con cRNA de hP2X4R tras 36 h de incubación. Vistos bajo objetivo 2X

7.4. Registros Electrofisiológicos.

La expresión del cRNA del receptor hP2X4 en los ovocitos de *Xenopus laevis* formó canales homoméricos funcionales de P2X4R, los cuales se caracterizaron por presentar una sensibilidad media al ATP, como la obtenida tras analizar las corrientes generadas en 19 células, por medio del cálculo de la concentración efectiva media ($EC_{50} = 67 \mu\text{M}$), la activación a bajas concentraciones de ATP ($0.1 \mu\text{M}$), máxima respuesta a ATP $300 \mu\text{M}$ (Fig. 7a), cinética de desensibilización media ($\text{Tau} = 5.4 \pm 0.1 \text{ s}$, $n=19$) y aumento de la amplitud de corriente proporcional a la concentración del agonista, ATP (Fig. 7b).

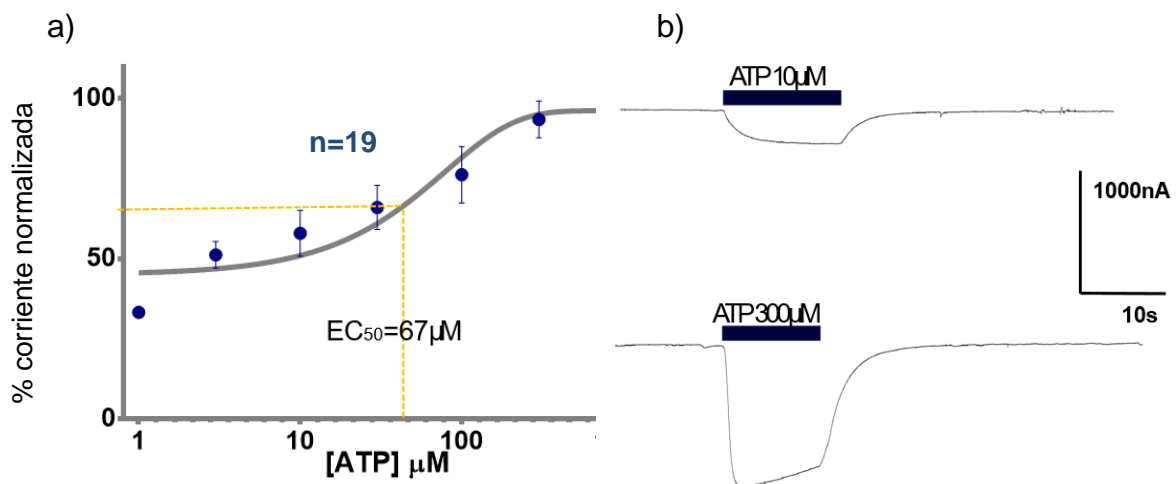


Figura 7. Respuestas generadas por la aplicación de ATP sobre hP2X4R

a) La curva dosis respuesta de ATP presentó una $EC_{50} = 67 \mu\text{M}$. **b)** Las corrientes entrantes aumentan de manera proporcional al aumentar la concentración de ATP.

Así mismo al realizar la aplicación de EtOH a diferentes concentraciones en concomitancia con el agonista clásico (ATP [100 μ M]) en un total de 8 células analizadas. Se encontró una $IC_{50}=10.25$ mM (Fig. 8a), cinética de desensibilización media ($\tau=7.68 \pm 0.9$ s, $n=8$) manteniendo la cinética característica del receptor hP2X4R, así como también se observó la inhibición de las corrientes generadas por ATP (100 μ M) al aplicar ATP (100 μ M) y EtOH a diversas concentraciones (1-100mM), de manera proporcional a la concentración de EtOH aplicada (Fig. 8b).

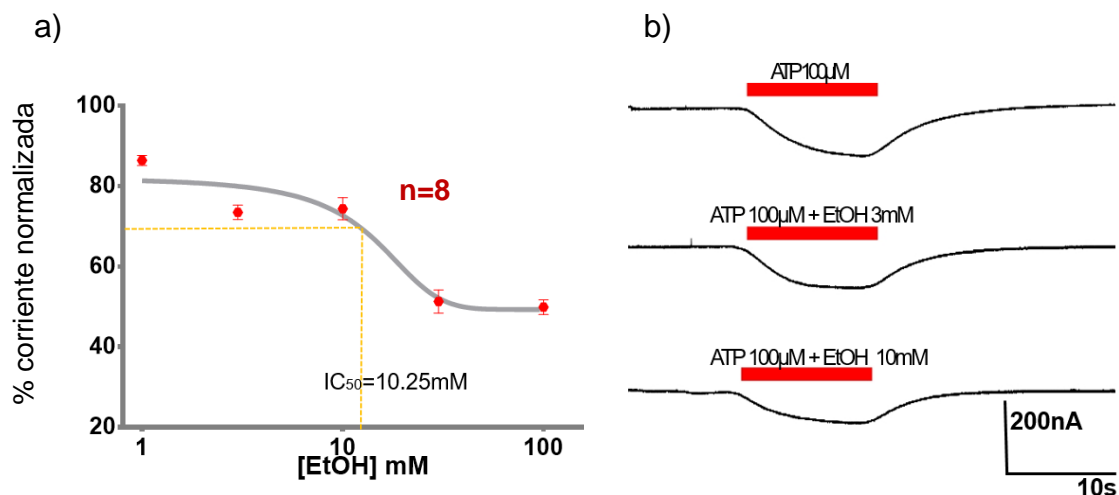


Figura 8. El etanol tiene un efecto inhibitorio sobre el hP2X4R de humano expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*

a) La curva dosis respuesta tuvo una $IC_{50}=10.25$ mM. **b)** El efecto inhibitorio del etanol sobre el hP2X4R de humano es dependiente de la concentración de etanol con la aplicación constante de ATP (100 μ M).

De manera contraria, la aplicación de IVM en concomitancia con el agonista clásico (ATP 100 μM) sobre los ovocitos de rana expresando el receptor homomérico P2X4 de humano en un total de 6 células analizadas, mostraron una potenciación dependiente de la concentración de IVM. La curva dosis vs respuesta presentó una $\text{EC}_{50}=0.5\mu\text{M}$ (Fig. 9a). La cinética de las corrientes se mantuvo con las características correspondientes del receptor hP2X4 ($\text{Tau}=1.5 \pm 0.4$), aunque parece mostrar una desensibilización más rápida bajo la acción de la IVM en comparación con el control (Fig. 9b).

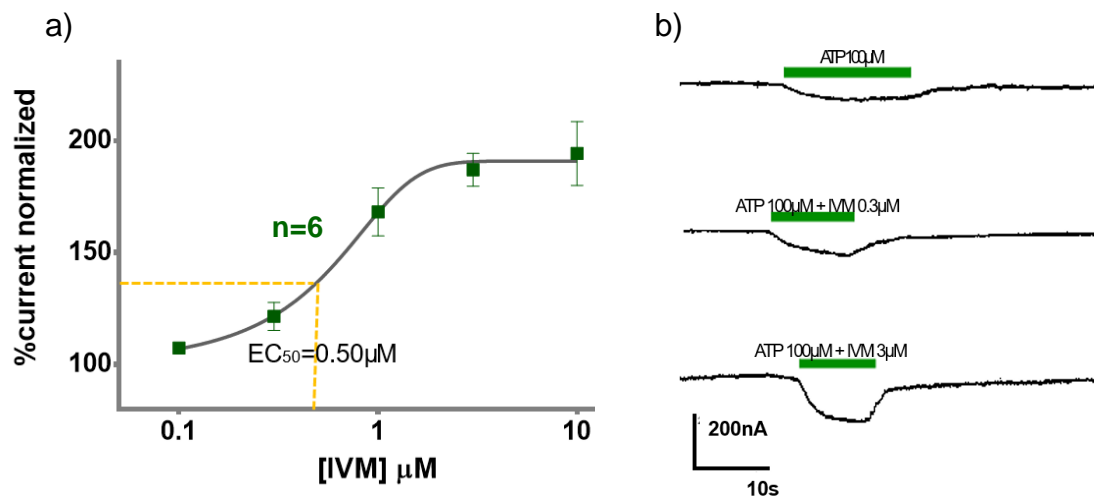


Figura 9. La Ivermectina potencia las corrientes inducidas por ATP en el hP2X4R expresado en ovocitos de rana *Xenopus laevis*

a) La curva dosis respuesta mostró una $\text{EC}_{50}=0.50 \mu\text{M}$. b) Las corrientes inducidas por ATP son potenciadas por ivermectina de forma concentración dependiente.

Como parte de los controles se realizó la inyección de solución control sin cRNA a 8 ovocitos, los cuales no registraron corriente alguna incluso a al aplicar altas concentraciones de ATP (1 mM) (Fig. 10a), de manera similar fueron inyectados 8 ovocitos con cRNA de hP2X4R en los cuales no se registraron corrientes entrantes al perfundir con EtOH (100 mM) (Fig. 10b) o IVM (10 μ M) (Fig. 10c) en ausencia de ATP.

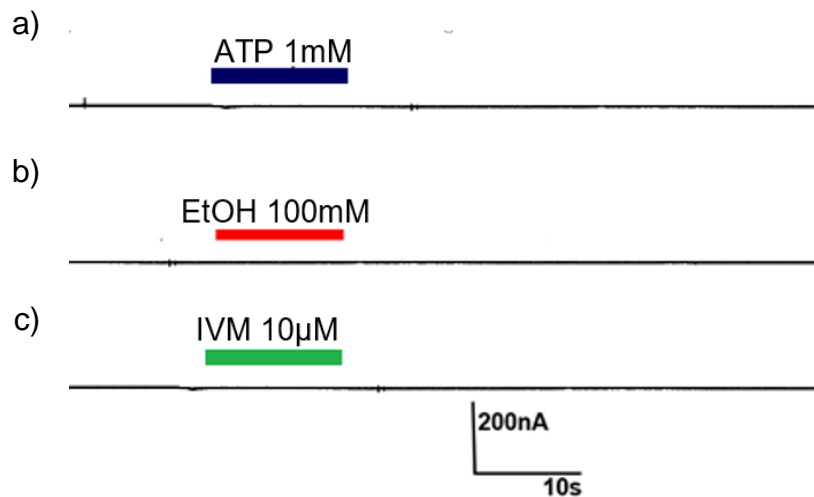


Figura 10. Registros control en ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*

a) Registro de la aplicación de ATP a altas concentraciones a (1 mM) a ovocitos inyectados con solución control sin mRNA b) Registro de la aplicación de EtOH a altas concentraciones (100 mM) sin presencia de ATP a ovocitos expresando hP2X4R c) Registro de la aplicación de IVM a altas concentraciones (10 μ M) sin presencia de ATP a ovocitos expresando hP2X4R.

VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como propósito el caracterizar las propiedades farmacológicas de IVM y EtOH sobre el receptor P2X4 de humano, expresado en ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis* por medio de registros electrofisiológicos con la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos.

Siendo el primer trabajo que muestra los efectos moduladores de IVM y EtOH sobre el receptor P2X4 de humano. Así mismo, se encontró la concentración óptima de cRNA a inyectar para la expresión del hP2X4R ya que el único trabajo en el que se usó el P2X4R de humano en el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*, reportaba la inyección de 100 ng/ovocito de cRNA (Dhulipala et al., 1998), concentración que al ser probada, resultó altamente tóxica para los ovocitos, causando apoptosis celular, posiblemente debido a que los canales P2X4R son altamente permeables a Ca^{+} , el cual al elevar su concentración intracelular influye en los procesos apoptóticos, lo que deriva en la erosión de la membrana y expulsión del contenido intracelular. Sin embargo el trabajo de Dhulipala et al., fue la base de ésta tesis de investigación, marcando un punto de partida para determinar las condiciones adecuadas de incubación (16°C/36h) y concentración (0.1ng/ovocito) de cRNA de P2X4R de humano inyectado en los ovocitos.

Es importante señalar, que pese a que se tiene cierta identidad (87% para rata-humano) y secuencias conservadas entre los genes ortólogos de P2X4R (Jones et al., 2000), las características farmacológicas de los mismos, varían entre sí (Garcia-Guzman et al., 1997) y al encontrar reportes de los efectos de IVM y EtOH sobre el receptor P2X4 sólo de las especies rata o ratón (Asatryan et al., 2010), el presente trabajo de investigación resulta relevante puesto que, al estandarizar la metodología para la expresión adecuada de P2X4R de humano en el sistema de expresión heteróloga, ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*, fue posible realizar la caracterización farmacológica de los canales homoméricos formados por P2X4R, mediante la técnica de TEVC. Obteniendo en las corrientes entrantes

activadas por ATP una $EC_{50}=67 \mu\text{M}$, como la potenciación de las mismas por la modulación alostérica y positiva tras la perfusión de IVM-ATP, generando una $EC_{50}=0.50\mu\text{M}$, así como una $IC_{50}=10.25\text{mM}$ por la co-aplicación de EtOH-ATP sobre el receptor; concentraciones medias que difieren de lo reportado hasta el momento sobre P2X4R de rata, por lo que se sugiere en trabajos posteriores, realizar un control dentro del mismo centro de trabajo con P2X4R de rata y así poder comparar específicamente entre ambos grupos de datos..

Diversos autores han descrito la expresión fisiológica del receptor P2X4, principalmente en membranas de organelos y vesículas endosómicas (Boumechache et al., 2009; Xu et al., 2014), hecho que se traduce en baja o nula expresión en membrana plasmática, lo cual representa uno de los mayores retos para llevar a cabo su estudio en sistemas de expresión heteróloga, específicamente, ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*, dificultando su estudio por la TEVC.

Las vesículas endosómicas propias de los ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*, fueron descritas en el trabajo publicado por Eppig y Dumont en 1976, quienes reportaron que el uso de FBS, HS o plasma como aditivos al medio de incubación, permite el mantenimiento de vesículas endosómicas en membrana celular, por lo que la formulación de un medio de incubación que permitiera mantener por tiempo suficiente en buen estado los ovocitos y por lo tanto aumentar el tráfico del receptor P2X4 de las vesículas endosómicas a la membrana celular, fue uno de los mayores logros del presente trabajo.

Dichas vesículas fueron observadas como puntos oscuros alrededor de la membrana de los ovocitos inyectados con cRNA de P2X4R humano tras 36 horas de incubación (Fig. 6). Así mismo al realizar los registros electrofisiológicos por la TEVC, sobre los ovocitos antes mencionados, éstos mostraron corrientes entrantes tras la aplicación de ATP, es decir, formaron canales homoméricos hP2X4R funcionales, permeando iones del espacio extracelular al intracelular, hecho que permitió realizar la caracterización farmacológica propuesta.

IX. CONCLUSIONES

A lo largo del presente trabajo de investigación, se determinaron las condiciones ideales para la expresión funcional del receptor homomérico P2X4 de humano en el sistema de expresión heteróloga, ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*, resaltando la concentración de cRNA (0.1ng/ovocito) a inyectar; la formulación de un medio adecuado, tiempo (36 h o más) y temperatura de incubación (16°C); las cuales discrepan con el reporte encontrado al respecto.

Así mismo fue posible identificar las concentraciones medias requeridas para activar, inhibir y potenciar las corrientes entrantes generadas por ATP sobre el receptor membranal antes mencionado, siendo ATP $EC_{50}=67 \mu\text{M}$, EtOH $IC_{50}=10.25 \text{ mM}$, e IVM $EC_{50}= 50 \mu\text{M}$ respectivamente. Por lo referido anteriormente se valida la hipótesis planteada.

Ante las escasas publicaciones que hace referencia a la expresión de P2X4R de humano en el sistema de expresión heteróloga, ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis*; ésta investigación cobra importancia, pues en comparación con los trabajos reportados acerca de los receptores P2X4 ortólogos, la caracterización farmacológica de los mismos, resulta significativamente diferente (B. S. Khakh et al., 2001), sin embargo es de resaltar que una vez estandarizada la técnica para la correcta expresión funcional del receptor P2X4 de humano en ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis* y su estudio por la TEVC; aún queda investigación por realizar sobre el receptor, por lo que se propone la ejecución de un nuevo protocolo donde se apliquen en concomitancia ATP (100 μM), IVM (0.1–10 μM) y EtOH (1–10 mM), para en posteriores trabajos y de acuerdo a los resultados obtenidos, se extrapolen las concentraciones adecuadas para un posible estudio piloto en humanos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adelsberger, H., Lepier, A., & Dudel, J. (2000). Activation of rat recombinant alpha(1)beta(2)gamma(2S) GABA(A) receptor by the insecticide ivermectin. *European journal of pharmacology*, 394(2–3), 163–170.

Ambion. (2014). mMESSAGE mMACHINE ® T7 Ultra Kit Synthesis of Translation Enhanced Capped Transcripts. *Manual*, (1345).

Asatryan, L., Popova, M., Perkins, D., Trudell, J. R., Alkana, R. L., & Davies, D. L. (2010). Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 334(3), 720–728.

Babcock, A. A., Kuziel, W. A., Rivest, S., Owens, T., Dietrich, W. D., Koninck, Y. De, ... Lacroix, S. (2003). Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(21), 7922–7930.

Barak, S., Carnicella, S., Yowell, Q. V, & Ron, D. (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses alcohol- induced allostasis of the mesolimbic dopaminergic system: implications for alcohol reward and seeking. *Neuroscience*, 37(27), 9885–9894.

Baxter, A. W., Choi, S. J., Sim, J. A., & North, R. A. (2011). Role of P2X4 receptors in synaptic strengthening in mouse CA1 hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 34(2), 213–220.

Belssaso Guido, Estañol Bruno, J. H. (2002). Nuevas estrategias farmacológicas en el tratamiento de las Adicciones, 1–12.

Bo, X., Kim, M., Nori, S. L., Schoepfer, R., Burnstock, G., & North, R. A. (2003). Tissue distribution of P2X 4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell and Tissue Research*, 313(2), 159–165.

Bo, X., Zhang, Y., Nassar, M., Burnstock, G., & Schoepfer, R. (1995). A P2X

purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Letters*, 375(1), 129–133.

Bortolato, M., Yardley, M. M., Khoja, S., Godar, S. C., Asatryan, L., Finn, D. a, ... Davies, D. L. (2013). Pharmacological insights into the role of P2X4 receptors in behavioural regulation: lessons from ivermectin. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16, 1059–1070.

Boumechache, M., Masin, M., Edwardson, J. M., Gó, D. C., & Murrell-Lagnado, R. (2009). Analysis of Assembly and Trafficking of Native P2X4 and P2X7 Receptor Complexes in Rodent Immune Cells.

Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W. (Robert W., & Price, D. L. (Donald L. (2006). *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*.

Brake, A. J., Wagenbach, M. J., & Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, 371(6497), 519–523.

Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R. a, & Surprenant, a. (1996). An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *The EMBO journal*, 15(1), 55–62.

Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., & Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, 377(6548), 428–431.

Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., & Stojilkovic, S. S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews*, 63(3), 641–683.

Davies, D. L., Bortolato, M., Finn, D. A., Ramaker, M. J., Barak, S., Ron, D., ... Olsen, R. W. (2013). Recent Advances in the Discovery and Preclinical Testing of Novel Compounds for the Prevention and/or Treatment of Alcohol Use Disorders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(1), 8–15.

Dhulipala, P. D. K., Wang, Y. X., & Kotlikoff, M. I. (1998). The human P2X4 receptor gene is alternatively spliced. *Gene*, 207(2), 259–266.

Enciclopedia Médica A.D.A.M. (s/f). Cirrosis del hígado: MedlinePlus enciclopedia médica ilustración. Recuperado el 27 de octubre de 2016, de https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/8849.htm

Enciclopedia Médica A.D.A.M. (2016). Ivermectina: MedlinePlus medicinas. Recuperado el 7 de noviembre de 2016, de <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a607069-es.html>

European Medicines Agency. (2010). Guideline on the development of medicinal products for the treatment of alcohol dependence, 2008(February), 1–17.

European Medicines Agency. (2012). European Medicines Agency recommends approval of medicine for reduction of alcohol consumption, 44(December).

Fountain, S. J., & North, R. A. (2006). A C-terminal lysine that controls human P2X4 receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry*, 281(22), 15044–15049.

Franklin, K. M., Asatryan, L., Jakowec, M. W., Trudell, J. R., Bell, R. L., & Davies, D. L. (2014). P2X4 receptors (P2X4Rs) represent a novel target for the development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 8(8 JUN), 1–12.

Garcia-Guzman, M., Soto, F., Gomez-Hernandez, J. M., Lund, P. E., & Stühmer, W. (1997). Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Molecular Pharmacology*, 51(1), 109–118.

Geary, T. G. (2005). Ivermectin 20 years on: Maturation of a wonder drug. *Trends in Parasitology*, 21(11), 530–532.

Guzzo, C. A., Furtek, C. I., Porrás, A. G., Chen, C., Tipping, R., Clineschmidt, C.

M., ... Lasseter, K. C. (2002). Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects. *Journal of clinical pharmacology*, 42(10), 1122–1133. Hargreaves WA, G. J. (2005). Efectividad y Costo de Risperidona y Olanzapina para la Esquizofrenia: Revisión Sistemática.

Howard, R. J., Slesinger, P. A., Davies, D. L., Das, J., Trudell, J. R., & Harris, R. A. (2011). Alcohol-binding sites in distinct brain proteins: The quest for atomic level resolution. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(9), 1561–1573.

Jelínková, I., Yan, Z., Liang, Z., Moonat, S., Teisinger, J., Stojilkovic, S. S., & Zemková, H. (2006). Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(2), 619–625.

Johnson, B. A., Rosenthal, N., Capece, J. a, Wiegand, F., Mao, L., Beyers, K., ... Swift, R. M. (2007). Topiramate for Treating Alcohol Dependence. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 298(14), 1641–1651.

Jones, C. A., Chessell, I. P., Simon, J., Barnard, E. A., Miller, K. J., Michel, A. D., & Humphrey, P. P. A. (2000). Functional characterization of the P2X 4 receptor orthologues. *British Journal of Pharmacology*, 129, 388–394.

Joshi, S., Kapur, J., Rogawski, A., Delgado-Escueta, A. V, Noebels, J. L., Avoli, M., & Olsen, R. W. (2012). GABA A Receptor Plasticity During Status Epilepticus. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*.

Kawano, A., Tsukimoto, M., Noguchi, T., Hotta, N., Harada, H., Takenouchi, T., ... Kojima, S. (2012). Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(2), 374–380.

Khakh, B., & North, A. (2006, agosto 3). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*.

Khakh, B., Proctor, W., Dunwiddie, T., Labarca, C., & Lester, H. (1999). Allosteric

control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(17), 7289–7299.

Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C. L., King, B. F., North, R. A., Séguéla, P., ... Humphrey, P. P. A. (2001). International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews*, 53(1), 107–118.

Khoja, S., Shah, V., Garcia, D., Asatryan, L., Jakowec, M. W., & Davies, D. L. (2016). Role of purinergic P2X4 receptors in regulating striatal dopamine homeostasis and dependent behaviors. *Journal of Neurochemistry*, 139(1), 134–148.

Krause, R. M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P. J., Galzi, J. L., Changeux, J. P., & Bertrand, D. (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular pharmacology*, 53(2), 283–294.

Laboratorio Elea S.A.C.I.F. y A. (2010). *Iver P*®. Sanabria.

Maccioni, P., Colombo, G., & Carai, M. a M. (2010). Blockade of the cannabinoid CB1 receptor and alcohol dependence: preclinical evidence and preliminary clinical data. *CNS & neurological disorders drug targets*, 9(1), 55–59.

OPS. (2015a). Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud (10ma revisión) CIE X. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems - ICD-10*, (554), F00-F99.

OPS, O. (2015b). *Informe de situación regional sobre el alcohol y la salud en las Américas. 2015*.

Pierce, R. C., & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 30(2), 215–238.

Ponce, G., Jiménez-Arriero, M. A., & G, R. (2003). Tratamiento farmacológico de la

dependencia alcohólica Farmacological treatment on alcohol dependence. *Trastornos Adictivos*, 5(1), 27–32.

Popova, M., Trudell, J., Li, K., Alkana, R., Davies, D., & Asatryan, L. (2013). Tryptophan 46 is a site for ethanol and ivermectin action in P2X₄ receptors. *Purinergic Signalling*, 9(4), 621–632.

Priel, A., & Silberberg, S. D. (2004). Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X₄ receptor channels. *The Journal of general physiology*, 123(3), 281–293.

Salazar, Guillermo J.; Antuñano, M. J. (2005). Alcohol and its Effect on Pilots. Recuperado el 22 de junio de 2018, de <http://flightphysical.com/pilot/alcohol.htm>

Sambrook, J., & Russel, D. W. (2000). Molecular Cloning, 3-Volume Set: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harboc Laboratory Press*.

Sattelle, D. B., Buckingham, S. D., Akamatsu, M., Matsuda, K., Pienaar, I., Jones, A. K., ... Blundell, C. D. (2009). Comparative pharmacology and computational modelling yield insights into allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 78(7), 836–843.

Schneider, R. K., Levenson, J. L., & Schnoll, S. H. (2001). Update in addiction medicine. *Annals of internal medicine*, 134(5), 387–395.

Schuckit, M. (2009). Trastornos por consumo de alcohol - Artículos - IntraMed. Recuperado el 14 de agosto de 2017, de <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=58690>

Shen, J.-B., Pappano, A. J., & Liang, B. T. (2006). Extracellular ATP-stimulated current in wild-type and P2X₄ receptor transgenic mouse ventricular myocytes: implications for a cardiac physiologic role of P2X₄ receptors. *The FASEB Journal*, 20(2), 277–284.

Solini, A., Santini, E., Chimenti, D., Chiozzi, P., Pratesi, F., Cuccato, S., ... Virgilio, F. Di. (2007). Multiple P2X receptors are involved in the modulation of apoptosis in

human mesangial cells: evidence for a role of P2X₄. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(5), F1537–F1547.

Soto, F., Garcia-Guzman, M., Gomez-Hernandez, J. M., Hollmannt, M., Karschin, C., & Stuhmer, W. (1996). P2X₄: An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Neurobiology*, 93, 3684–3688.

Steensland, P., Simms, J. A., Holgate, J., Richards, J. K., & Bartlett, S. E. (2007). Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, selectively decreases ethanol consumption and seeking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), 12518–12523.

Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., ... Hogenesch, J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6062–6067.

Surprenant, A., Buell, G., & North, R. A. (1995). P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends in neurosciences*, 18(5), 224–229.

Tabakoff, B., Saba, L., Printz, M., Flodman, P., Hodgkinson, C., Goldman, D., ... Hoffman, P. L. (2009). Genetical genomic determinants of alcohol consumption in rats and humans. *BMC Biol*, 7, 70.

Vademecum Vidal. (2015). Tiaprida. Recuperado el 11 de marzo de 2016, de <http://www.vademecum.es/principios-activos-tiaprida-n05a103>

Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A., & Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, 371(6497), 516–519.

Williams, S. H. (2005). Medications for treating alcohol dependence. *American Family Physician*, 72(9), 1775–1780.

Wyatt, L. R., Finn, D. A., Khoja, S., Yardley, M. M., Asatryan, L., Alkana, R. L., & Davies, D. L. (2014). Contribution of P2X4 receptors to ethanol intake in male C57BL/6 mice. *Neurochemical Research*, 39(6), 1127–1139.

Xiao, C., Zhou, C., Li, K., Davies, D. L., & Ye, J. H. (2008). Purinergic Type 2 Receptors at GABAergic Synapses on Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons Are Targets for Ethanol Action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(1), 196–205.

Xiong, K., Li, C., & Weight, F. F. (2000). Inhibition by ethanol of rat P2X(4) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *British journal of pharmacology*, 130(6), 1394–1398.

Xu, J., Chai, H., Ehinger, K., Egan, T. M., Srinivasan, R., Frick, M., & Khakh, B. S. (2014). Imaging P2X4 receptor subcellular distribution, trafficking, and regulation using P2X4-pHluorin. *The Journal of general physiology*, 144(1), 81–104.

Yardley, M. M., Neely, M., Huynh, N., Asatryan, L., Louie, S. G., Alkana, R. L., & Davies, D. L. (2014). Multiday administration of ivermectin is effective in reducing alcohol intake in mice at doses shown to be safe in humans. *NeuroReport*, 25(13), 1018–1023.

Yardley, M. M., Wyatt, L., Khoja, S., Asatryan, L., Ramaker, M. J., Finn, D. A., ... Davies, D. L. (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology*, 63(2), 190–201.

Young, M. T., Fisher, J. A., Fountain, S. J., Ford, R. C., North, R. A., & Khakh, B. S. (2008). Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 26241–26251.