



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Efectos de Ivermectina sobre el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*.
Posible rol de receptores purinérgicos P2X4

Seminario de título presentado a la
Facultad de ciencias naturales y oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Claudio Joaquín Catrupay Valdebenito

Concepción, marzo de 2024



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.



Prof. Guía

Dr. Patricio Castro Maldonado

Prof. Co-guía

Dr. Carlos Burgos Arias

Prof. Evaluadores

Dr. Jorge Fuentealba Arcos

Dra. Marcela Torrejón Quezada

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, marzo de 2024

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo quiero agradecer a todos lo que brindaron apoyo e hicieron posible su realización:

Empezando por mi tutor, el doctor Patricio Castro por aceptarme y guiarme dentro del laboratorio de Fisiología y farmacología para el desarrollo neural desde que comencé con mi práctica profesional. Muchas gracias por su apoyo y tiempo brindado para poder convertirme en un mejor estudiante y futuro profesional.

Agradecer también sus correcciones en el escrito, al igual que al Dr. Carlos Felipe Burgos.

Agradecer también a los miembros de comisión de mi tesis, Dra. Marcela Torrejón y Dr. Jorge Fuentealba por su disposición y exigencia en cada presentación de mi etapa de formación como profesional.

Agradecer también al Departamento de fisiología por sus consejos y responder cada inquietud cada vez que preguntaba, en especial a la Dra. Viviana Pérez para la realización de los *Whole mount* presentados en el trabajo, sin ella no hubiese sido posible.

Agradecer a mis compañeros de LAND por las experiencias compartidas y colaboración: Ángel, Nicolas y Gloria. Así como también a cada tecnólogo médico que pasó durante la formulación y desarrollo de este seminario de título, en especial a Belén.

A mis compañeros de carrera por siempre brindar apoyo, en especial a mi mejor amiga Claudia Márquez por su apoyo y aguante incondicional.

Agradecer también el apoyo fundamental de mi polola Tiare. Por apoyarme, animarme, ayudarme y compartir un pedacito de su vida, por entenderme cada vez que necesitaba tiempo para el desarrollo de este seminario y por estar en cada Western que no salía y celebrar cada experimento que sí lo hizo, muchas gracias Lexiana.

Agradecer a los movimientos estudiantiles, que hicieron posible el acceso a la educación superior a mí y a miles de compañeros.

Por supuesto, a mis mejores amigos: Alexander, Matías, Enrique y Milovan, por sus tardes de risas y siempre escucharme. En especial a Alexander sus frases y estoicismo.

Al apoyo de mi familia, en especial el apoyo incondicional y la preocupación de mi Mamá Rosa como también la paciencia de mis ambos padres, pese a no entender lo que hacía, siempre me animaron a que siguiera lo que me hiciera feliz.

Finalmente, agradecer a las fuentes de financiamiento, proyecto FONDECYT 1231038 a cargo del Dr. Patricio Castro.

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
ABSTRACT.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1. Ivermectina	10
2. Señalización purinérgica	11
3. Neurulación.....	12
4. Rol de los factores de transcripción en la diferenciación de motoneuronas: Implicaciones en la formación de la unión neuromuscular y su evaluación.....	14
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
Hipótesis	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas.....	19
1.1 Declaración ética y animales de experimentación.....	19
1.2 Obtención de embriones de <i>Xenopus laevis</i>	19
2. Técnicas <i>In silico</i> : Análisis bioinformático interacción P2X4-IVM.....	20
2.1. Selección de moléculas.....	20
2.2. Modelamiento y preparación de proteína P2X4.....	20
2.3. Docking proteína-ligando entre P2X4 e IVM.....	21
2.4 Análisis Docking Molecular e interacciones entre proteína-ligando.....	22
3. Técnicas de Biología molecular: Western Blot y RT-qPCR en tiempo real.....	22
3.1. Ensayo Western Blot	22
3.2. Ensayos RT-qPCR en tiempo real.....	23
4. Tratamiento farmacológico y análisis morfológico.....	26
4.1. Tratamiento con IVM en neurulación de <i>Xenopus laevis</i>	26
4.2. Caracterización fenotípica.....	26
5. Técnicas histológicas: Inmunofluorescencia en <i>whole mount</i>	26
6. Análisis estadístico.....	27
IV. RESULTADOS.....	28
1.1. Expresión de P2X4 en estadios de desarrollo de <i>Xenopus laevis in vitro</i>	28
1.2. Estudio y análisis de posibles sitios de interacción en receptores P2X4.....	29
2. Uso de IVM en neurulación induce DTN.....	35

3. Perfil de expresión de FTs en renacuajos de <i>Xenopus laevis</i>	40
4.1 Expresión de la unión neuromuscular mediante <i>Whole-Mount</i> en renacuajos.	43
4.2. Expresión de la unión neuromuscular mediante cortes histológicos y tinción hematoxilina-eosina.....	46
V. DISCUSIÓN.....	48
1.- Presencia y rol de P2X4, señalización purinérgica.	48
2. El uso de IVM durante la neurulación causa efectos en etapa larval.	49
3. Factores de transcripción y cambios morfológicos.....	50
VI. BIBLIOGRAFIA.....	52

RESUMEN

La neurulación es un proceso crucial para conformar el sistema nervioso central (SNC) en cordados, que implica el pliegue de la placa neural para formar el tubo neural, estructura que dará origen a todas las células del SN.

Para el desarrollo adecuado de este proceso, es necesaria una fina comunicación entre las células precursoras neurales, que regulan los eventos requeridos como migración, diferenciación, proliferación, entre otros. Existen receptores purinérgicos ionotrópicos (P2Xn) y metabotrópicos (P2Yn), los que son activados por ATP y otros nucleótidos para establecer la “señalización purinérgica” en procesos como la neurulación, expansión de células progenitoras, neurogénesis, crecimiento y maduración axonal.

Los defectos de tubo neural (DTNs) son producto de un cierre defectuoso del tubo neural y representan los principales defectos congénitos del sistema nervioso. El uso de anticonvulsivos durante el embarazo, como el ácido valproico, se ha vinculado con los DTNs. Por lo tanto, es necesario evaluar el perfil de seguridad de los anticonvulsivos, especialmente durante el desarrollo neural temprano.

Para evaluar la participación de la señalización purinérgica en *Xenopus laevis* durante neurulación, utilizamos ivermectina (IVM), un modulador alostérico positivo (PAM) de los receptores P2X4 humanos utilizado ampliamente para tratar infecciones parasitarias y recientemente propuesto como anticonvulsivo.

Por ello, el objetivo de este seminario de título fue determinar los efectos en la formación del sistema nervioso temprano (DTN) y características fenotípicas de la unión neuromuscular y la actividad locomotora de embriones de *Xenopus laevis* expuestos a la presencia de Ivermectina durante el proceso de neurulación.

Para ello usamos distintas metodologías como técnicas de biología molecular como RT-qPCR, Western blot, técnicas farmacológicas como exposición a IVM en distintas concentraciones, técnicas bioinformáticas a través de la construcción de modelos y docking y por último técnicas histológicas para la evaluación de las estructuras que conforman la unión neuromuscular.

Nuestros resultados demostraron la expresión del receptor purinérgico P2X4 durante un periodo crítico del desarrollo embrionario, y predicciones de su interacción utilizando modelos generados mediante modelamiento comparativo confirmaron sus capacidades in silico para unir IVM. Asimismo, la aplicación de IVM produjo defectos de tubo neural abierto en los embriones tratados, junto con un aumento en el área ($80,90 \pm 5,270 \text{ mm}^2$) y cantidad de melanocitos

relativos ($49,60 \pm 10,02$) en comparación con los controles. Observamos además parálisis locomotora en 92% de los embriones tratados. Se evidenció la presencia de transcritos de los factores de transcripción asociados a diferenciación de motoneuronas NKX 6.1 y HB9, acompañados de cambios morfológicos en las estructuras de la unión neuromuscular, difusión en los receptores de acetilcolina, posible activación de procesos de autofagia y múltiples núcleos alargados en las fibras musculares en los embriones tratados.

Considerando estos resultados, proponemos que los receptores P2X4 serian modulados por IVM, estableciendo un mecanismo de acción a través de liberación de Ca^{2+} , activando la señalización purinérgica, responsable los efectos mencionados.

ABSTRACT

Neurulation is a crucial process to form the central nervous system (CNS) in chordates, which involves the folding of the neural plate to form the neural tube, a structure that will give rise to all the cells of the NS. For the proper development of this process, a fine communication between neural precursor cells is necessary, which regulate the required events such as migration, differentiation, proliferation, among others. Purinergic receptors, known as ionotropic (P2Xn) and metabotropic (P2Yn), are activated by ATP and other nucleotides to establish "purinergic signaling" in processes such as neurulation, progenitor cell expansion, neurogenesis, axonal growth and maturation.

Neural tube defects (NTDs) result from defective closure of the neural tube and represent the major birth defects of the nervous system. The use of anticonvulsants during pregnancy, such as valproic acid, has been linked to NTDs. Therefore, there is a need to evaluate the safety profile of anticonvulsants, especially during early neural development.

To evaluate the involvement of purinergic signaling in *Xenopus laevis* during neurulation, we used ivermectin (IVM), a positive allosteric modulator (PAM) of human P2X4 receptors widely used to treat parasitic infections and recently proposed as an anticonvulsant.

Therefore, the objective of this title seminar was to determine the effects on early nervous system (NTD) formation and phenotypic characteristics of the neuromuscular junction and locomotor activity of *Xenopus laevis* embryos exposed to the presence of Ivermectin during the neurulation process.

For this we used different methodologies such as molecular biology techniques like RT-qPCR, Western blot, pharmacological techniques like exposure to IVM in different concentrations, bioinformatics techniques through model building and docking and finally histological techniques for the evaluation of the structures that conform the neuromuscular junction.

Our results demonstrated the expression of the purinergic P2X4 receptor during a critical period of embryonic development, and predictions of its interaction using models generated by comparative modeling confirmed its *in silico* abilities to bind IVM. Furthermore, IVM application resulted in open neural tube defects in treated embryos, along with an increase in area ($80.90 \pm 5.270 \text{ mm}^2$) and number of relative melanocytes (49.60 ± 10.02) compared to controls. We also observed locomotor paralysis in 92% of the treated embryos. The presence of transcripts of transcription factors associated with differentiation of motor neurons NKX 6.1 and HB9, accompanied by morphological changes in the structures of the neuromuscular

junction, diffusion of acetylcholine receptors, possible activation of autophagy processes and multiple elongated nuclei in muscle fibers in treated embryos was evidenced.

Considering these results, we propose that P2X4 receptors would be modulated by IVM, establishing a mechanism of action through Ca^{2+} release, activating purinergic signaling, responsible for the mentioned effects.

I. INTRODUCCIÓN

1. Ivermectina

La ivermectina es una de las drogas antiparasitarias más ampliamente utilizadas en animales y humanos, siendo usada en alrededor de 3,7 mil millones de dosis en campañas de distribución masivas de medicamentos (MDA) en todo el mundo durante los últimos 30 años (Nicolas et al, 2020). Su principal uso es tratar la oncocercosis y la filariasis linfática. La primera es una enfermedad producida por el nemátodo filárico *Enchocora Vólvulos*, transmitida por el vector diptarens de la mosca negra, infectando al humano con microfilarias en la piel (Aquino & Vittes, 2020), y una vida media de 9 a 12 meses siendo la responsable de la patología (Milton et al. 2020). Mientras que la filariasis linfática es causada por el parásito nematodo *Wuchereria bancrofti*, siendo transmitida por varias especies de mosquitos (Taylor et al., 2010). Adicionalmente, también se ha usado recientemente como antiviral para el COVID 19 y otros virus de ARN monocatenario de sentido positivo (Heidary, 2020), así como también para el tratamiento de epilepsia en conjunto con otras drogas anticonvulsivas (Mandro et al., 2020). Su uso en mujeres embarazadas ocurre de manera inadvertida, sin tener en consideración los riesgos que podría causar su uso para la madre y/o hijo.

La ivermectina es un compuesto semisintético de color blanco a amarillo y agente vermífugo de administración oral derivado de las avermectinas, no higroscópico con un punto de fusión de aproximadamente 155°C, insoluble en agua y distribuida en tabletas de 3 mg (Drugs.com, 2022). La ivermectina es metabolizada en el hígado y al momento de ser expulsada del organismo, la ivermectina y sus metabolitos son excretados casi exclusivamente mediante las heces en un tiempo estimado de 12 días, con menos del 1% de la dosis administrada eliminada por la orina. La vida media de la ivermectina en el plasma es de aproximadamente 18 horas después de ser administrada (Drugs.com, 2022).

Las dosis terapéuticas suelen ser entre 150 a 400 µg/kg en los tratamientos de filariasis y la oncocercosis en periodos de cada 6 o 12 meses (Merck Sharp & Dohme (NZ) Ltd, 2021). Sin embargo, cuando es usada como droga coadyuvante para la epilepsia, se suministran en dosis de 10 mg tres o siete veces por semana durante 12-24 meses (Diazgranados- Sánchez, 2017).

2. Señalización purinérgica

El adenosín trifosfato (ATP), es un compuesto que captura y almacena energía libre de los procesos catabólicos, cumpliendo un rol de reserva universal de energía en el metabolismo celular, presentándose en todas las células vivas (Sperlágh & Vizi, 1996). Además de su rol como reserva energética en los sistemas biológicos, cumple la función de señalización en distintas partes de un organismo, como el cerebro, y también durante el desarrollo embrionario, en donde el ATP participa directamente sobre sus receptores ionotrópicos P2X, que corresponden a canales iónicos abiertos por ligandos, y metabotrópicos P2Y, correspondientes a receptores acoplados a proteína G (GPCRs), por lo que el análisis de la presencia, activación y señalización son relevantes para el estudio de su participación en los mecanismos que permiten la embriogénesis (Massé & Dale, 2012).

La señalización purinérgica cumple un papel fisiológico en el sistema nervioso central (SNC), siendo capaz de inducir remodelaciones en el citoesqueleto de las terminales nerviosas y mecanismos exocitóticos, y pudiendo interactuar con otros receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Miras-Portugal, 2007). Asimismo, los receptores P2X y P2Y exhiben un rol durante los estadios tempranos de desarrollo, como el desarrollo ocular y otros, por lo que la señalización purinérgica ha sido descrita como morfógena (Miras-Portugal, 2007; Dale, 2008; Massé K, Dale N 2012).

Los receptores ionotrópicos P2X_n, corresponden a receptores activados por ligando de tres subunidades homo o heteroméricos de los subtipos P2X_{1,2,3,4,5,6,7} (Oliveira, et al., 2016). Son activados por ATP y sus análogos como ADP, UTP y otros, uniéndose al sitio ortostérico extracelular y dando lugar a un cambio conformacional que abre un canal permeable de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ (Khakh et al., 2001).

La familia de los receptores purinérgicos P2Y metabotrópicos contiene los miembros de P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}. Se dividen en 3 familias, según la proteína G a la cual se acoplan y la naturaleza de su nucleótido antagonista. De manera general, los P2Y se acoplan a través de la proteína G_q, a la fosfolipasa C (PLC) e induce la movilización y aumento del calcio intracelular con la consiguiente activación de la proteína quinasa C (PKC) (Miras-Portugal, 2007).

La despolarización y apertura de los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje inducen la señalización dentro de la célula y desencadenan diferentes respuestas celulares como, por ejemplo, el cierre del tubo neural mediante constricción apical, activada por ATP extracelular

y mediante señalización auto y paracrina (Christodoulou & Skourides., 2015; Suzuki et al., 2017).

Interesantemente, estudios con Ivermectina demuestran que actúa como un potente regulador alostérico positivo del receptor P2X4 (Priel & Silberberg, 2004; Jelínkova et al., 2006; Jelínkova et al., 2008). El receptor P2X4 se caracteriza por ser el canal con mayor permeabilidad de Ca^{2+} en la familia P2X (Stokes et al, 2017), como también presentar una especificidad por IVM en comparación con otros receptores pertenecientes a la familia P2X (Latapiat et al., 2017).

3. Neurulación

Dentro de las primeras etapas del desarrollo embrionario, encontramos el comienzo de la formación del sistema nervioso. Este comienza con la neurulación primaria, la cual consiste en el plegado de la placa neural para formar el tubo neural, el cual posteriormente dará forma al SNC conformado por el cerebro y la médula espinal. Este proceso comienza en humanos en la etapa 8 (CS8, Carnegie stages), es decir, en un aproximado de 18 días después de la fecundación, momento en que mediante el engrosamiento de la región medial del ectodermo se forma la placa neural (Eynard et al., 2008), y termina en la etapa 13, aproximadamente 28 a 32 días después de la fecundación una vez que el tubo neural se cierra. La neurulación secundaria comienza cuando el neuroporo caudal se cierra durante la etapa 12 y consiste en la formación de la médula espinal sin un desarrollo que involucre el ectodermo a diferencia de la neurulación primaria (O'Rahilly & Müller, 2007).

Muchos procesos fundamentales a nivel celular y molecular se encuentran altamente conservados en los vertebrados, por lo que *Xenopus laevis* es un organismo útil para estudiar el desarrollo de la médula espinal (Borodinsky, 2017). En términos comparativos, *Xenopus* comienza la etapa de neurulación en el estadio 12.5 cuando el blastoporo se cierra completamente y la notocorda se forma bajo el tejido ectodermal. a lo largo de la neurulación la placa neural comienza a plegarse sobre sí misma hasta formar el tubo neural en el estadio 20, esta etapa es alcanzada en 22 horas luego de la fertilización aproximadamente (Fig. 1).

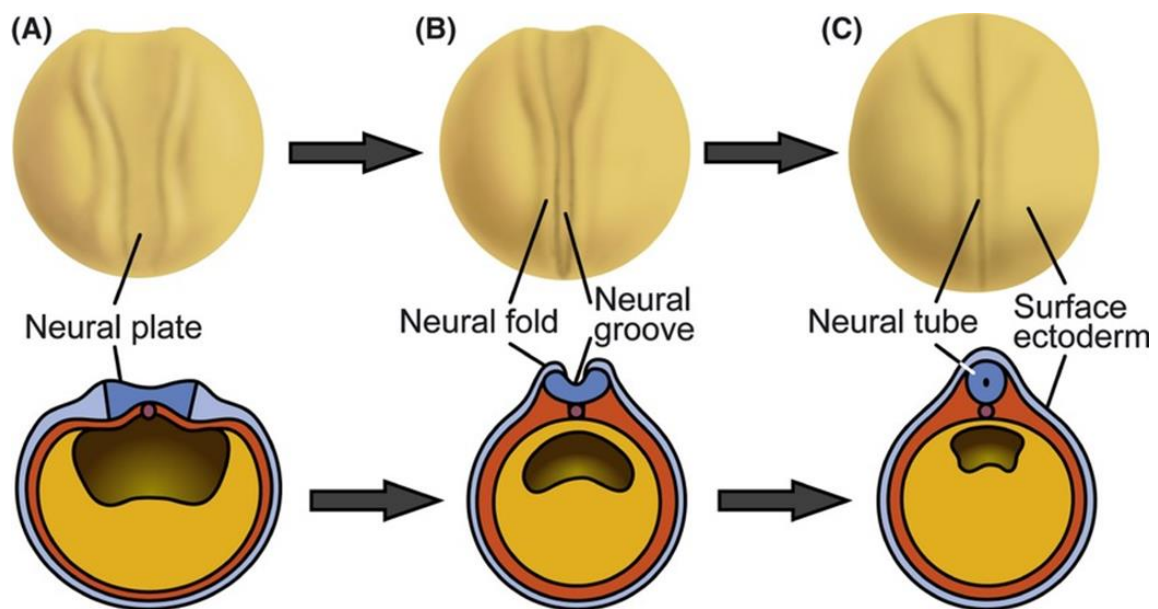


Figura 1. Proceso de neurulación *Xenopus Laevis*

Vista dorsal (arriba) y cortes transversales (abajo) del proceso de neurulación en embriones de anfibio en **A.** Neurulación temprana **B.** Intermedia **C.** Tardía. Terminando la gastrulación la placa neural (Azul) se forma desde el engrosamiento del ectodermo en la superficie dorsal del embrión, los bordes laterales de la placa neural comienzan a elevarse para formar las crestas neurales, las crestas neurales luego se unen formando la línea media dorsal para formar el tubo neural, que se posicionará bajo el ectodermo (celeste) (Extraído de Suzuki et al., 2012).

Enumerando algunas de las ventajas de usar el modelo animal de *Xenopus*, podemos mencionar que posee un huevo que mide aproximadamente 1 mm de diámetro, mientras que el de ratón, el modelo de desarrollo más popular en vertebrados, mide un aproximado de 100 μm (Massé & Dale, 2012). Esto permite una fácil manipulación para la expresión de algunos genes, así como también ingeniería genética mediante microinyecciones al huevo o al embrión ya fertilizado (Borodinsky, 2017). En segundo lugar, presentan una capa transparente que recubre los huevos, permitiendo visualizar las primeras etapas de la morfogénesis de la médula espinal a través de un enfoque de imagen no invasivo. Si bien es cierto que la médula espinal de *X. laevis* es mucho más simple que en vertebrados, ya que cuenta con un menor número de células espinales, tipos de neuronas espinales y conexiones entre ellas, sí se representan los principales tipos de células de la médula espinal, es decir neuronas sensoriales, interneuronas, neuronas motoras y células gliales (Borodinsky, 2017).

Fallas en los mecanismos encargados de la neurulación producen defectos del tubo neural (DTNs), que son las malformaciones más frecuentes globalmente, siendo

esta, la segunda malformación de nacimiento más común a nivel mundial y la primera asociada al SNC (Frey & Hauser, 2003). Dentro de los defectos del tubo neural se presentan la espina bífida, anencefalia, encefalocele y la iniencefalia, siendo la espina bífida y la anencefalia las dos formas más recurrentes de los defectos del tubo neural (Botto et al., 1999; Calderón et al., 2017). La tasa de recién nacidos con malformaciones del tubo neural es relativamente elevada, con una prevalencia de 15 a 23 niños por cada 10000 nacimientos (Blencowe et al., 2018). La incidencia de estas malformaciones aumenta cuando factores ambientales interceden con el desarrollo normal embrionario, entre ellas, el uso de drogas anticonvulsivas en el embarazo, aumentando la incidencia de malformaciones al desarrollo del SNC (Castro et al., 2022). En esta línea, la incidencia de malformaciones del tubo neural aumenta en un 10% con el uso de drogas antiepilépticas como el ácido valproico, durante el embarazo (Werler et al., 2011; Castro et al., 2022). Una revisión reciente señala que no se puede asegurar si la ivermectina es una droga segura durante el embarazo, por escasez de reportes publicados, además de la antigüedad de estos (Nicolas et. Al, 2020).

4. Rol de los factores de transcripción en la diferenciación de motoneuronas: Implicaciones en la formación de la unión neuromuscular y su evaluación.

Para que el tubo neural se forme adecuadamente, es necesario que se induzca la diferenciación de la placa neural, mediante la señalización proveniente de la notocorda a través la secreción de un morfógeno llamado Sonic hedgehog (Shh) (Dessaud, 2008; Placzek, 1993). Esta molécula también está presente durante el desarrollo del tubo neural en vertebrados, y se ha demostrado que Shh, estaría controlando la diferenciación de diversas células de la mitad ventral del tubo (Patten, 2000). El establecimiento del patrón dorso-ventral de los dominios progenitores del tubo, ocurre mediante la regulación de expresión de distintos factores de transcripción, donde esta regulación se produce por un gradiente de actividad de Shh. Dentro de los factores de transcripción presentes, podemos encontrar un grupo que reprime su expresión por la señalización de Shh, mientras que otro es necesario para que ocurra su expresión. El primer grupo incluye Pax7, Pax6 y lrx3, mientras que el segundo está conformado por Dbx1, Dbx2, Nkx6.1, Olig2, Nkx2.2 y Foxa2 (Dessaud, 2008). Debido a la actividad de gradiente de Shh y la actividad de los diferentes factores de transcripción se generan diferentes dominios, los cuales son: p3, pMN, p2, p1, p0. Estos dominios generan un

subtipo específico de neuronas y células gliales. Los progenitores celulares p0, p2 y p3 producen tres tipos distintos de interneuronas (V0-V3), mientras que pMN se caracteriza por ser el primero en generar motoneuronas (Danesin, 2017). Los factores encargados de formar pMN descritos son: Nkx6.1, Pax6, Olig2 y MNR2 (Gaufo, 2003; Vallstedt, 2001; Jessell, 2000). Estos factores de transcripción trabajan en conjunto para regular la especificación y diferenciación de las células contribuyendo así a la formación del dominio progenitor en el tubo neural (Fig. 2).

Una vez se decide el destino celular mediante los dominios, comienza la señalización encargada de darle identidad a las motoneuronas (MN), mediante la expresión de otros factores de transcripción. Existe evidencia de que para que ocurra la consolidación de la MN son necesarios los genes Hb9 (Arber, 1999), Nkx6.1 (Vallstedt, 2001; Dichmann, 2011), Nkx6.2 (De Marco Garcia, 2008; Toch, 2020), Isl1 (Liang, 2011; Pfaff, 1996), Lhx3 y Lhx4 (Sharma, 1998; Thaler, 2002), FoxP1 y FoxP2 (Dasen, 2008; Rousso, 2008; Moriyaka, 2009; Ludington, 2023).

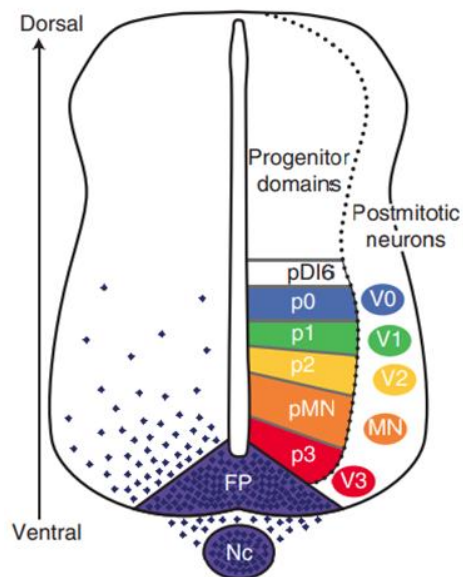


Figura 2. Establecimiento de la organización espacial de las neuronas proveniente de los dominios progenitores ventrales de la médula espinal.

Luego del cierre del tubo neural, se diferencian los 5 dominios: p3, pMN, p2, p1, p0. Este establecimiento se produce por la liberación de Shh (Morado), secretada desde la notocorda (Nc) a la placa neural (FP). (Extraído de Lovrics et al., 2014)

Una vez que la MN ha establecido su identidad, estas pueden comenzar a formar axones motores, los cuales migran por las raíces ventrales hasta el músculo blanco, innervando y formando la unión neuromuscular (UNM). La UNM es una sinapsis química excitatoria que se forma entre las terminaciones nerviosas de las neuronas motoras de la médula espinal y las fibras del músculo esquelético utilizando acetilcolina como neurotransmisor (Nishimune, 2018). En nuestro modelo de desarrollo, la UNM sigue un patrón rostro-caudal, durante el primer día de desarrollo, y se logra establecer una diferenciación muscular y neuronal de tejidos en las siguientes 24 hrs. Se puede observar la especialización de estructuras características de la UNM en los extremos de los músculos miotomales, seguido por la adquisición de la actividad motora espontánea y la eclosión. Sin embargo, no es hasta 4-5 días después de la fertilización que el renacuajo adquiere nado libre gracias a la maduración de sus UNM (Bermedo-García et al., 2018).

Como se menciona, la expresión coordinada e interacción entre los distintos factores de transcripción y moléculas señalizadores son cruciales para la correcta formación y función del sistema nervioso, por lo cual la alteración de un solo factor podría repercutir de manera directa o indirecta al origen de motoneuronas como se ha demostrado en distintos estudios

(Dichamann et al., 2011; Witzemann, 2006). Basados en los antecedentes descritos, consideramos que IVM durante la neurulación podría estar modulando la actividad de los receptores purinérgicos P2X4, afectando y desregulando la posterior expresión de factores de transcripción, posiblemente a través de un mecanismo dependiente de Ca²⁺ debido a la naturaleza del receptor P2X4.

Resultados obtenidos mediante experimentos preliminares y base de datos (www.xenbase.org) nos muestran la expresión de transcritos purinérgicos (P2Y1, 4, 11), como el receptor purinérgico P2X4, que es el principal blanco de ivermectina. Esta expresión se observa través de los distintos estadios de desarrollo presentes en la neurulación, más específicamente gástrula (E10), neurulación intermedia (E14) y cierre del tubo neural (E20).

Además, la evaluación fenotípica en tratamientos farmacológicos con ivermectina, nos revela que los embriones tratados con concentraciones de 10 µM poseen un aumento en la pigmentación (melanocitos) de los renacuajos, así como la ausencia del reflejo de escape (Roberts, 1990) y capacidad locomotora, es decir no nadan de manera espontánea (Jamieson, 2000), lo que nos sugiere una alteración a la formación o mecanismo de la UNM.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La presencia de ivermectina durante la neurulación, modularía los receptores purinérgicos P2X4, alterando la formación del sistema nervioso temprano y afectando sus funciones posteriores como la unión neuromuscular a través de la desregulación de factores de transcripción NKX 6.1 o HB9.

Objetivo general

Determinar los efectos en la formación del sistema nervioso temprano (DTN) y su posterior función a través de la evaluación de las características fenotípicas morfológicas, celulares y moleculares de la unión neuromuscular y la actividad locomotora basal de embriones de *Xenopus laevis* expuestos a la presencia de Ivermectina durante el proceso de neurulación.

Objetivos específicos

1. Evaluar la presencia y modulación del receptor purinérgico P2X4 durante la neurulación de *Xenopus laevis*.
2. Caracterizar los efectos fenotípicos de IVM en estadios de neurulación y juveniles en *Xenopus Laevis*.
3. Evaluar la presencia y niveles de expresión de factores de transcripción involucrados en la diferenciación de motoneuronas en embriones de *Xenopus laevis* tratados con IVM.
4. Evaluar la organización estructural (Receptores de AChRs, músculo) de la unión neuromuscular de embriones de *Xenopus laevis* tratados con IVM durante la Neurulación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas.

1.1 Declaración ética y animales de experimentación.

Los métodos implementados para el cuidado y manipulación del modelo *Xenopus laevis* fueron previamente aprobados y revisados por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas y por el comité de Ética, Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción (Fondecyt 1231038).

Los embriones fueron mantenidos en solución Marc's modified Ringer's (MMR al 10%, pH 7.4), Conteniendo NaCl 1 M, KCl 20 mM, MgSO₄*7H₂O 10 mM, CaCl₂ Dihidratado 20 mM, HEPES 50mM.

1.2 Obtención de embriones de *Xenopus laevis*.

La recolección de ovocitos de *Xenopus laevis* se realizó por medio de la técnica de fertilización *in vitro*. La ovulación de la rana hembra seleccionada fue inducida previamente mediante la inyección subcutánea de hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Con 48 hrs de anterioridad a la fertilización (pre-prime), la hembra fue inyectada con 50 unidades de hCG. 24 hrs después la hembra fue inyectada nuevamente con 350-500 unidades de hCG (prime) para inducir la ovulación. El macho fue previamente anestesiado en benzocaína y luego sacrificado, para extraer sus testículos, mediante una incisión abdominal. Los testículos fueron almacenados en medio MMR 1X suplementado con FBS. 12 hrs después de la segunda inyección de hCG se recolectaron los ovocitos en solución MMR 1X, posteriormente se fertilizaron con extracto de testículos de *X. laevis* y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en solución MMR al 10%, pH 7.4. Después, el medio de fertilización se reemplazó por una solución de cisteína al 2% en MMR 10%, pH 8.0 durante 10 minutos, con el objetivo de disolver la capa gelatinosa que protege los embriones, proceso conocido como "desgelatinización". Posteriormente, los embriones fueron lavados e incubados en MMR 10% a temperatura ambiente.

2. Técnicas *In silico*: Análisis bioinformático interacción P2X4-IVM.

2.1. Selección de moléculas.

La estructura de P2X4 de pez cebra utilizada como molde para el modelamiento comparativo de P2X4 fue extraída del Protein Data Bank PDB (Código 4DW1), resolución 2.8 Å (Hattori & Gouaux, 2012). La estructura de IVM (CID: 6321424) (PM: 875.1 g/mol) fue obtenida desde la estructura del receptor de glicina alpha 3 (Código 5VDH). Previo a su uso, IVM fue preparada asignando cargas, estados de protonación y enlaces rotables mediante el Software Autodock Tools Versión 1.5.7 (Trott & Olson, 2010), antes de realizar las simulaciones de docking molecular. Para ejecutar Vina, los formatos (proteína-ligando) fueron transformados y guardados como “pdbqt” conservando los átomos de hidrógenos polares para disminuir el gasto computacional en el docking molecular.

2.2. Modelamiento y preparación de proteína P2X4.

La proteína fue modelada usando la secuencia aminoacídica de P2X4 en *Xenopus laevis* (NP_001082067.1) obtenida del National Center of Biotechnology Information (NCBI), y la estructura de pez cebra (Código 4DW1) como plantilla/molde, debido a su alta identidad de secuencia (59%), utilizando el programa Modeller versión 10.4 (Eswar et al., 2006). Además, el alineamiento de P2X4 del pez cebra y *Xenopus laevis* mostró un 77% de conservación en las propiedades químicas entre sus secuencias,

La proteína molde fue preparada, lo cual incluyó que las moléculas de H₂O no estructurales y moléculas pequeñas usados para la cristalización de la estructura fueron eliminadas, se agregaron cadenas laterales e hidrógenos faltantes y se crearon puentes disulfuro a pH 7±0,2 a través del módulo Protein Preparation Wizard en el programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2024). En Modeller se generaron 100 modelos iniciales de los cuales fue elegido el mejor ranqueado basado en la función de puntuación interna del propio programa (molpdf) y DOPE, que evaluó la calidad de los modelos (Shen & Sali, 2006). El modelo final se obtuvo luego de una minimización de energía de la estructura utilizando el programa Macromodel (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2024).

2.3. Docking proteína-ligando entre P2X4 e IVM.

El docking molecular es un método de simulación computacional que predice la orientación e interacciones entre proteína ligando a un nivel atómico, primero, predice las posibles conformaciones del ligando y su posición dentro del sitio de unión, para luego evaluar las interacciones usando funciones de puntuación (Gohlke et al., 2000). Las predicciones para evaluar la capacidad de interacción de IVM sobre la superficie del modelo minimizado de P2X4 fueron realizadas con el programa Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021). La grilla utilizada fue posicionada en la región transmembrana del receptor P2X4, y se generaron 20 complejos ordenados según la puntuación obtenida dada su afinidad predicha entre la proteína-ligando expresada como una afinidad de unión o docking score (kcal/mol).

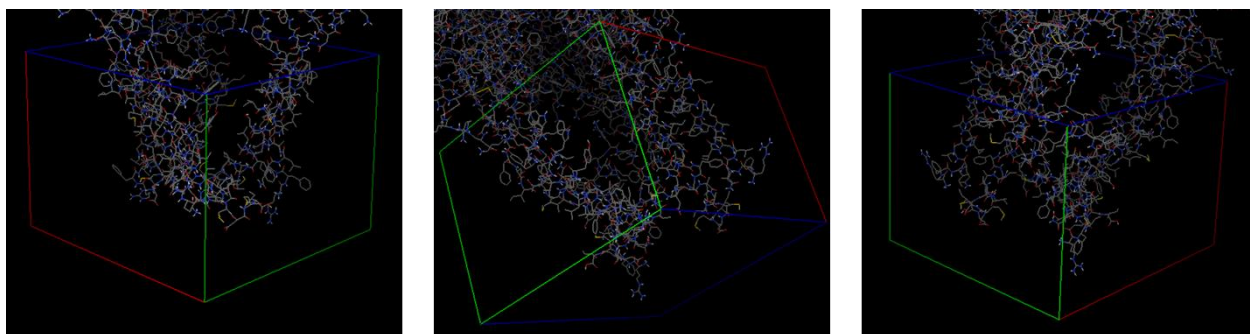


Figura 3. Visualización de la grilla ubicada en la porción TM de P2X4.

Se muestra la localización, tamaño y dimensión de la Grid box para docking molecular en el receptor P2X4, evidenciando la cobertura total del sitio transmembrana.

La configuración usada para la Grid box y Docking molecular en Vina fue:

Posición: [x][y][z]= [-8.16]; [8.275]; [102.953]

Tamaño: [x][y][z]= [48]; [49]; [36]

Exhaustividad: 250

2.4 Análisis Docking Molecular e interacciones entre proteína-ligando.

Una vez realizado el Docking, es posible identificar distintas agrupaciones o “clusters”, es decir una conformación repetida entre distintas poses que adopta el ligando, las cuales dan una aproximación en términos de orientación espacial y patrones de interacción con la proteína, y donde un clúster mayor representa a un sitio de unión putativo donde se produce una mayor afinidad (valor más negativo) entre la IVM y P2X4, es decir una mayor probabilidad de que se produzca una interacción favorable y estable (Nguyen et al., 2020).

Luego, se seleccionó la pose con mayor afinidad del clúster y se analizó con LigPlot (Wallace et al., 1995), caracterizando la interacción proteína-ligando, presentando un gráfico esquemático que representa las interacciones detectadas en los complejos proteína-ligando obtenidos. Finalmente, para calcular la energía libre de Gibbs perteneciente a un complejo se usó el programa PRODIGY-LIGAND (<https://bianca.science.uu.nl/prodigy/lig>) (Vangone et al., 2019) perteneciente a la página web PRODIGY (PROtein binDing enerGY prediction) (Honorato et al., 2021) y se comparó con otros resultados obtenidos en receptores funcionales disponibles en la bibliografía.

3. Técnicas de Biología molecular: Western Blot y RT-qPCR en tiempo real.

3.1. Ensayo Western Blot

3.1.1. Extracción de proteína total.

Para la extracción de proteína total de los estadios embrionarios de *Xenopus Laevis*: Estadio 12.5 (neurula temprana), 14 (intermedio), estadio 20 (tardío) y cerebro adulto, se utilizó buffer de lisis tritón, se homogenizaron las muestras en un volumen de 200 µL, para optimizar la cantidad de proteína obtenida. Las muestras se sometieron a una centrifugación de 10.000 g. durante 1 min. Posteriormente se extrajo el sobrenadante y se determinó la concentración usando un kit de Micro BSA (Thermofisher, Waltham, MA, E.E.U.U) y el equipo NOVostar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

3.1.2. Electroforesis y electrotransferencia en gel de poliacrilamida.

Se utilizó el gel denaturante de acrilamida al 12% (SDS-PAGE) para separar la proteína de interés. Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos con buffer de carga (Tris-HCL 62.5 mM, pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0,01%) y 100 mM DTT.

Se cargaron 240 µg de proteína total en gel junto a un marcador de proteína standard (Spectra Multicolor, Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific, MA, E.E.U.U) y se realizó la electroforesis a 100 Volt en una solución de corrida (Tris 25 mM, glicina 250 mM y 0,1 % SDS). Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en un buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %) a 250 mA durante 2 horas.

3.1.3. Inmunodetección de proteínas.

Se realizaron varios lavados con TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, Tween20 al 0,05%). La membrana se bloqueó con leche en TBS-T al 5% durante 1 h. Se llevó a cabo una incubación durante toda la noche a 4°C utilizando anticuerpos primarios. El anticuerpo primario fue anti-P2X4, con una secuencia de antígeno: KYKYVEDYEQGLSGEMNQ (1:250, Alome Labs, Jerusalem, Israel). La incubación del anticuerpo secundario se realizó durante 2 h. utilizando anticuerpos anti-conejo conjugados con peroxidasa (1:5000, ThermoFisher, Massachusetts, E.E.U.U.). La membrana se lavó con TBS-T durante 10 minutos 5 veces. Finalmente, la membrana fue revelada con una solución quimioluminiscente (Western Lightening, Plus-ECL, Perkin Elmer, Waltham, MA, E.E.U.U) en un equipo fotodocumentador para quimioluminiscencia y fluorescencia (Odyssey FC, Li-COR, Lincoln, NE, E.E.U.U). Con las medidas correspondientes al rango dinámico sobre la señal de fondo, sólo se utilizó un pico claro y distinguible de la señal de fondo.

3.2. Ensayos RT-qPCR en tiempo real.

3.2.1. Extracción de ARN total.

Para la extracción ARN total del estadio 45 (premetamorficos) de *Xenopus laevis* tratados distintas concentraciones de IVM durante neurulación y cerebro adulto, se utilizó el kit E.Z.N.A HP Total RNA, homogeneizando las muestras en 500 µL de buffer de lisis GTC, este volumen se implementó en base a las instrucciones del fabricante por cantidad de tejido (20-30 mg, 700µL). Las muestras se sometieron a centrifugaciones y lavados con 500 µL de etanol 70% v/v. Finalmente, el ARN total se eluyó en 30 µL de agua libre de ARNasa y se cuantificó midiendo su absorbancia de 260 nm y su pureza de acuerdo a la relación 260/280. Se utilizaron solamente muestras que tuvieran sobre 200 ng de ARN y una pureza sobre 1.9.

3.2.2. Transcripción reversa (RT) del ARN total.

La síntesis de ADN se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MuLV Enzyme Mix (ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit), agregando 1 µg de cada muestra de ARN total. Para un volumen final de 20 µL, se incubó el ARN con 0,5 µg de oligo-dT, denaturó a 70°C por 5 minutos y se llevó a hielo durante 2 minutos. posteriormente se agregó el buffer de transcripción M-MuLV Reaction Mix (Tris-HCL 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂, 3 mM, DTT 10 mM), 400 U de la enzima transcriptasa reversa M-MuLV Enzyme Mix y se incubó por 1 h a 42°C y finalmente a 70°C por 5 min.

3.2.3. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR)

La reacción fue realizada con el kit Brilliant II SYBR Green qCPR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) en un volumen final de 20 µL, conteniendo 5 µL de ADNc y 250 nM de cada set de partidores (Tabla 1. El gradiente de temperatura usada fue 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos, en un termociclador AriaMX Real-time PCR System (Agilent Technologies, Inc.). La cuantificación de expresión relativa se calculó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación con el gen de referencia Sub-1 (Mughal et al., 2018). Los controles negativos fueron realizados para la amplificación de cada muestra fueron realizadas usando el mismo protocolo, pero sin añadir ADNc reemplazándolo por H₂O.

Nombre	Primer sense 5'-3'	Primer antisense 5'-3'	Producto (pb)
Sub1	AGCAGGAGAAATGAAGCCAGG	CCGACATCTGCTCCTTCAGT	80
Mnx1	TTCTGACTGCACATCCGAGG	GGGTGATACTGGCTCAGTGG	70
NKX6.1	CCGGAAGGACTCCCATCTTT	AACACAGAGCCCTGATTGGG	94
NCAM	ACAGATGTCAAGAGCACCCC	ATTCCAATAACACCACCCCT	120

Tabla 1. Lista de partidores usados para RT-qPCR convencional (producto final de amplificación).

3.2.4 Electroforesis en geles de agarosa

Se utilizó electroforesis en gel de agarosa con el fin de evaluar los amplicones de los fragmentos de ADN. Se prepararon geles de agarosa al 1% en solución TAE 0.5X (Tris-Ácido Acético EDTA; Tris-HCl 40 mM, Ácido acético 30 mM y EDTA 1 mM; pH 7,6), con bromuro de etidio en una concentración final de 0.5 ug/mL. Las muestras fueron mezcladas con un buffer de carga loading dye purple 1 x (Ficoll 2,5%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 3.3 mM, 0.02% purple dye) y cargadas en el gel. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific). La corrida electroforética se realizó a 80 V por 40 min en buffer TAE en una cámara de electroforesis y la visualización de los fragmentos se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

4. Tratamiento farmacológico y análisis morfológico.

4.1. Tratamiento con IVM en neurulación de *Xenopus laevis*.

Se incubaron 10 embriones al inicio de la neurulación (Estadio 12,5) en MMR 10% en una placa de 12 pocillos con diferentes concentraciones de ivermectina (IVM) (0,1; 0,5; 1, 10 μ M). Durante 12 horas de incubación los embriones (Estadio 20) fueron lavados tres veces con MMR 10% y mantenidos en esa solución hasta el estadio de renacuajo (estadio 40-45). el análisis y toma de imágenes se realizó en un estéreo microscopio NIKON modelo SMZ25, acoplado a una cámara campo claro amscope, objetivo 1x (embriones estadio 20), objetivo 0,63x (renacuajos) y objetivo 2x (región interdigital renacuajos) en los cuales se determinó los efectos e implicaciones morfológicas en el proceso de neurulación.

4.2. Caracterización fenotípica

Utilizando el programa ImageJ se analizó los fenotipos obtenidos en los embriones tratados, así como también cuantificar la pigmentación y compararla con los controles. Para los ensayos de movilidad de los renacuajos fueron aislados en una placa Petri de 60 mm para posteriormente ser sometidos a pruebas de reacción las cuales según el tipo de movilidad que expresaban, caracterizándolo como: “normal”, “reducida” y “paralizada”.

La pigmentación fue cuantificada con la cantidad de melanocitos relativa de la región interocular, esto quiere decir que se tomaron fotos en 2X desde la perspectiva dorsal. Usando ImageJ, se convirtieron las fotos en monocromáticas y se ajustó el umbral, las imágenes obtenidas fueron procesadas con la herramienta “Watershed” para separar las células que estuvieran solapadas. Posteriormente las imágenes fueron analizadas con la herramienta “Analyze particles”, obteniendo el área y cantidad de melanocitos relativos.

5. Técnicas histológicas: Inmunofluorescencia en *whole mount*.

Para analizar los cambios morfológicos de la UNM se marcaron los componentes celulares de la UNM, músculo y AChR. Posterior a que los embriones alcanzaron el estadio pre metamórfico (E45), fueron fijados en Formaldehído (FA) 0,5% (v/v) en PBS 1X a temperatura ambiente durante 90 min. Luego, se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos en agitación (50-70 rpm) a temperatura ambiente. Los renacuajos fueron incubados con glicina 0,15 M en PBS 1X durante 30 min. y luego permeabilizados mediante lavados con PBST (PBS 1X/Tritón X-100 0,5% (v/v)) 10 veces durante 10 minutos.

Posteriormente los renacuajos fueron bloqueados con PBST-BSA 4% (p/v) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizó la incubación del anticuerpo primario Neurofilamento M (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania) (1:1000), que sirve para marcar los axones, en PBST-BSA 4% (p/v) durante 90 min. a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4°C. A continuación, los renacuajos fueron lavados varias veces con PBST en agitación durante 2 h., y luego incubados con dilución del anticuerpo secundarios (1:300) junto con α BTX Alexa-488 (1:500) y DAPI (1:100) en PBST-BSA 4% (p/v) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los renacuajos fueron lavados con PBST durante 2 h y luego PBS 1X. Finalmente los renacuajos fueron montados entre dos cubreobjetos en medio de montaje para fluorescencia (DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), adhiriendo los cubreobjetos en sus bordes con cianoacrilato.

Las imágenes fueron adquiridas en el Microscopio Confocal Espectral SP8 LIGHTING, Leica ubicado en el centro de microscopía avanzada (CMA) Bio Bio.

Posteriormente, usando la herramienta Z Project en ImageJ, se proyectaron los *stacks* usando la intensidad promedio en las distintas micrografías obtenidas, usando las micrografías con mayor aumento (40X), se cuantificó el área e intensidad de la señal obtenida de los AchRs unida a α BTX, que se encontraban en la mitad dorsal, entre los chebrones 7 y 8 contando desde la zona anterior.

6. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico, cada muestra fue comparada con su respectivo control. Estos análisis se realizaron en el programa GraphPad Prism 9.4.1 Software. Los resultados se expresaron en promedio \pm desviación estándar y se determinaron diferencias significativas mediante ANOVA de una vía y t-test con corrección de Welch según correspondiese. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS

De acuerdo con lo anterior se propone que la presencia y modulación de los receptores purinérgicos P2X4 durante la neurulación, estarían causando alteraciones en los factores de transcripción durante estadios posteriores. Para conocer si los P2X4 están presentes o no en este proceso se evaluó la presencia de la proteína en embrión completo durante la formación del tubo neural.

Objetivo 1: “Evaluar la presencia y modulación del receptor purinérgico P2X4 durante la neurulación de *Xenopus laevis*.”

1.1. Expresión de P2X4 en estadios de desarrollo de *Xenopus laevis in vitro*.

Resultados obtenidos mediante experimentos preliminares y base de datos (www.xenbase.org) nos muestran la expresión del transcrito de distintos receptores purinérgicos (P2X4, P2Y1, P2Y4, P2Y11), a través de los distintos estadios de desarrollo presentes en la neurulación, más específicamente estadio temprano (E12.5), neurulación intermedia (E14) y cierre del tubo neural (E20).

El resultado del ensayo Western Blot, evidenció la expresión de P2X4 en estadios temprano, intermedio y tardío de neurulación, así como también cerebro adulto, mostrando bandas definidas, mientras que el control negativo, no muestra señal (Fig. 4). Esto confirma una expresión constante de P2X4 durante los estadios evaluados.

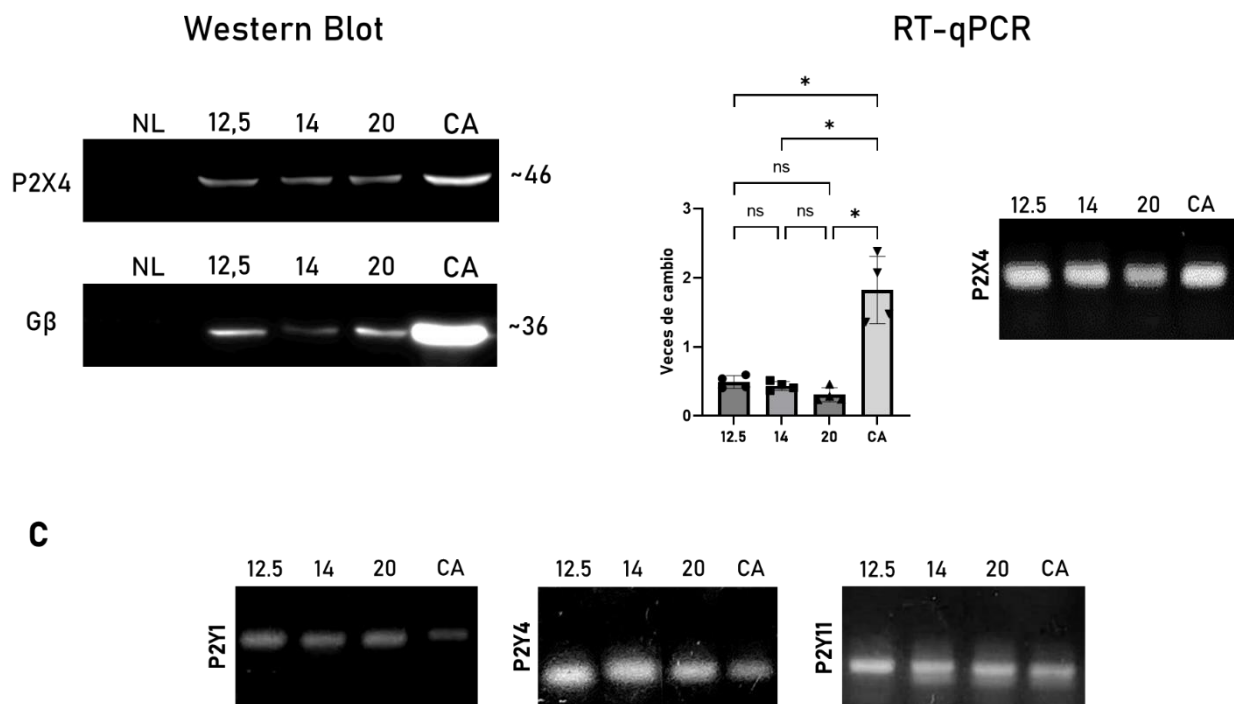


Figura 4. Detección de P2X4 en embriones de *Xenopus laevis*.

A. Análisis western blot de distintos estadios de embriones en neurulación (12,5; 14; 20) y cerebro adulto (CA) con P2X4 y G β como control de carga. Control negativo: NL (Non-loaded). N=1. **B.** RT-qPCR de P2X4 en estadios de neurulación (12,5; 14; 20) y cerebro adulto. Expresión de patrones migratorios electroforéticos de P2X4 en estadios de neurulación (12,5; 14; 20) y cerebro adulto (CA). **C.** Expresión de patrones migratorios electroforéticos de receptores purinérgicos metabotrópicos (P2Y1; P2Y4; P2Y11) en estadios de neurulación (12,5; 14; 20) y cerebro adulto (CA). N=4. La expresión transcripcional del receptor fue normalizado al gen control sub-1. ANOVA de una vía, corrección de Dunnett, (ns=no significativo, $P < 0.05$). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.

1.2. Estudio y análisis de posibles sitios de interacción en receptores P2X4.

La interacción del receptor purinérgico con ivermectina en *Xenopus laevis* se evaluó mediante herramientas *in silico*. Para predecir la interacción se realizaron múltiples dockings proteína-ligando, consistentes en dos etapas, búsqueda y evaluación correspondientemente. Con el objetivo de determinar el sitio de unión más probable y estable con que IVM se une a P2X4, en los dominios de la región transmembrana del receptor, se generaron complejos que mostraron 3 posibles sitios de unión y ordenados por su afinidad (kcal/mol) (Fig. 5).

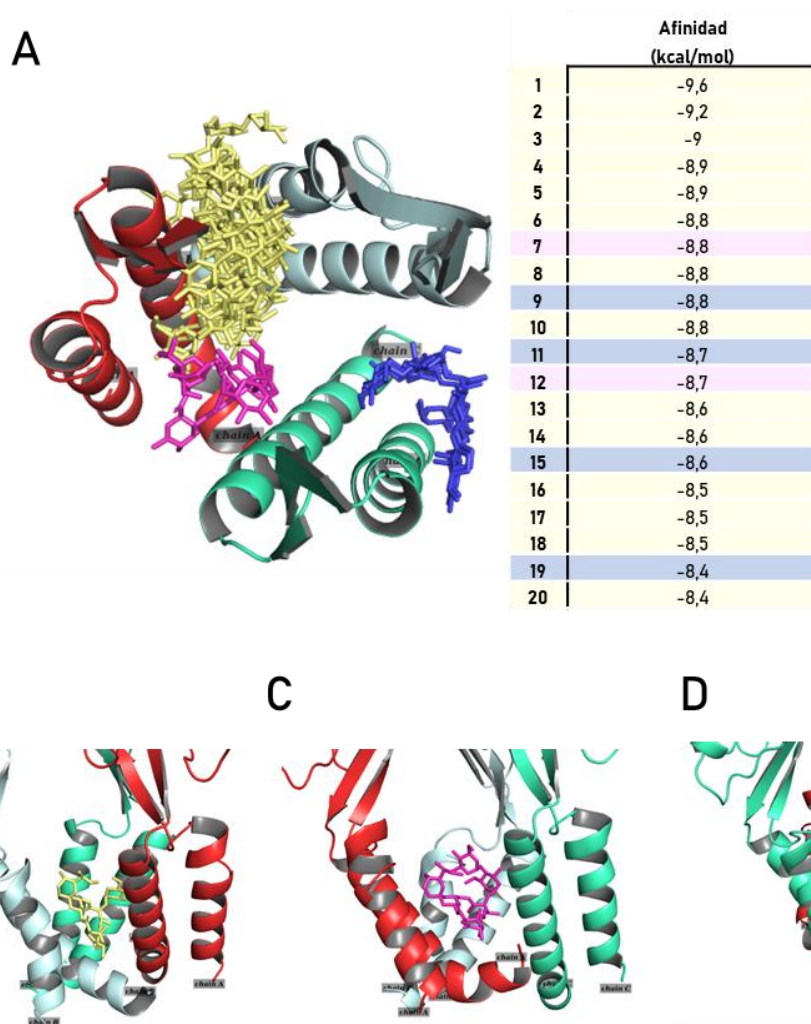


Figura 5. Conformaciones y resultados de energía de unión de IVM en P2X4 predichos en Autodock Vina.

A. Se muestra el resultado del docking proteína-ligando de IVM en el modelo de P2X4 de *Xenopus laevis*. Las estructuras roja, gris y verde representan a una subunidad. El primer panel presenta 20 resultados de la simulación de acoplamiento molecular IVM-P2x4 sobrepuestos, mostrando la convergencia de los resultados mediante la formación de 3 clústeres de conformaciones en los sitios de unión. Tabla resumen detalla la puntuación de acoplamiento de IVM a los distintos sitios de unión, enlistando en la tonalidad amarilla los complejos (1-6; 8; 13; 14; 16-18; 20) formado entre las cadenas A y B, mientras que en rosa (7; 12) se presentan los complejos formados entre las cadenas A y C. Por último, en azul los complejos formados (9; 11; 15; 19) entre las cadenas B y C. **B.** Acoplamiento de IVM con P2X4 en el complejo 1. **C.** Acoplamiento de IVM con P2X4 en el complejo 7. **D.** Acoplamiento de IVM con P2X4 en el complejo 9.

De estas conformaciones posibles se seleccionó la con mayor afinidad de cada clúster como se muestra en la figura 5B-D, midiendo las propiedades energéticas mediante la interacción de los contactos atómicos con PRODIGY-LIGAND usando la opción "no electrostatics protocol", el cual mide el número de contactos atómicos dentro de 10.5Å y clasificándolos de acuerdo el átomo involucrado en la interacción (Tabla 2).

Complejo	ΔG_{noelec} (Kcal/mol)	CC	CO	CN	CX	OO	OX	NO
1	-11,21	3437	1952	834	19	283	7	249
7	-9,87	2976	1539	648	57	203	16	164
9	-8,81	2618	1325	501	22	169	6	152

Tabla 2. Propiedades energéticas obtenidas de los complejos formados.

Se presenta una lista de los 3 complejos mejor evaluados en Autodock Vina, calculando el ΔG_{noelec} , es decir que se calcula la energía sin considerar la energía electrostática. C: Carbono, O: Oxígeno, N: Nitrógeno, X: Cualquier otro átomo.

Las interacciones de los 3 complejos seleccionadas fueron analizadas con LigPlot, presentando 2 interacciones completamente hidrofóbicas, coincidentemente con lo descrito bibliográficamente (Jelínková et al., 2006; Stojilkovic et al., 2010), mientras que el tercer complejo encontrado presenta también enlaces de hidrógenos (Fig. 6). Los átomos que componen estas interacciones son hidrofóbicas son: ILE41, TYR44, VAL45, VAL49, ILE338, ASN339, SER342, GLY343, LEU346, LEU353, ILE357 de la cadena A. ILE41, TYR44, VAL49, ILE334, ILE338, LEU346, VAL349, LEU353 de la cadena B. GLY40, ILE41, GLY47, MET337, ILE338, SER342, ALA345 de la cadena C. Mientras que los enlaces que presentan enlaces de hidrógenos son: TYR44 y TRP48 de la cadena C.

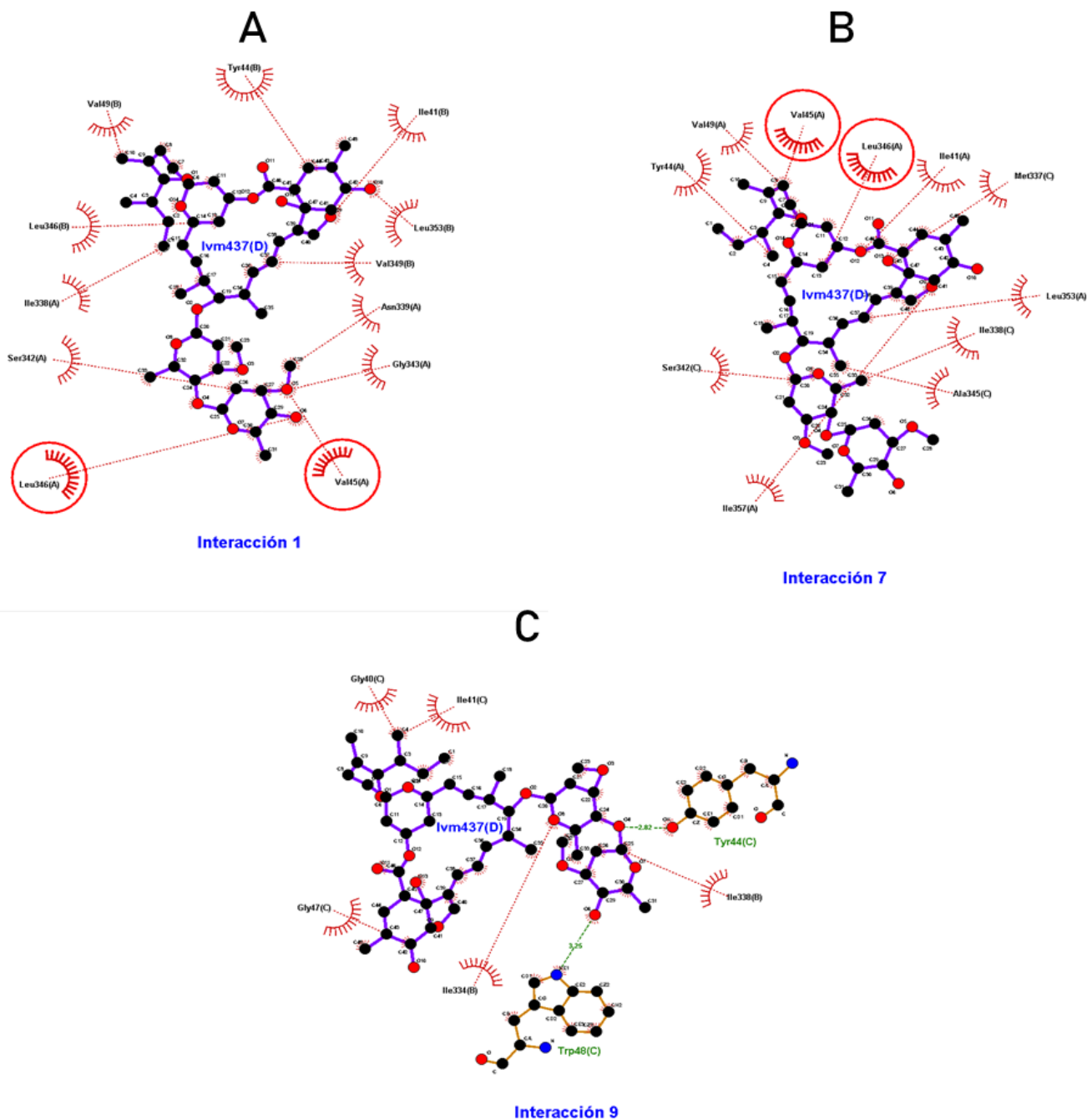


Figura 6. Esquemas proteína-ligando de los complejos P2X4-IVM 1, 7 y 9 en LIGPLOT.

Esquema de interacción en los complejos P2X4-IVM 1, 7 y 9. Se aprecian los residuos no pertenecientes al ligando IVM (437:D), junto a la cadena que pertenece. Similar a una pestaña o abánico, en color rojo, unido con una línea discontinua se muestran los residuos que interactúan de manera significativamente hidrofóbica con la molécula de IVM (437:D). En color marrón se puede observar los residuos interactuando mediante un enlace de hidrógeno. El enlace de hidrógeno se muestra como una línea verde discontinua, detallando su longitud. Los círculos rojos identifican los residuos que son equivalentes en los distintos esquemas.

Los esquemas muestran coincidencias en los residuos VAL45 y LEU346 de la cadena A de los complejos 1 y 7, expresando una interacción hidrofóbica, sin embargo, no interactúan con los mismos átomos de IVM (437:D), debido a que el ligando toma una posición distinta en cada complejo. Habiendo identificado los residuos que interactúan con la proteína, se realizó un alineamiento en JalView del modelo realizado en *Xenopus Laevis*, la secuencia usada para la creación de receptores mutantes de P2X4 de rata expresado en un ovocito de *Xenopus Laevis* y células HEK 293 y cuya modulación funcional por IVM fue demostrada por estudios electrofisiológicos modulables y funcionales por IVM (Latapiat et al., 2017). Considerando los residuos identificados por Latapiat, se identificó que existe una alta correlación entre los residuos predichos y confirmados experimentalmente, a excepción de LEU346, que en *Xenopus laevis* corresponde como una PHE347, sin embargo, esta sustitución es semiconservada ya que ambos residuos comparten propiedades químicas como lo son su hidrofobicidad y que son apolares (Fig. 7).

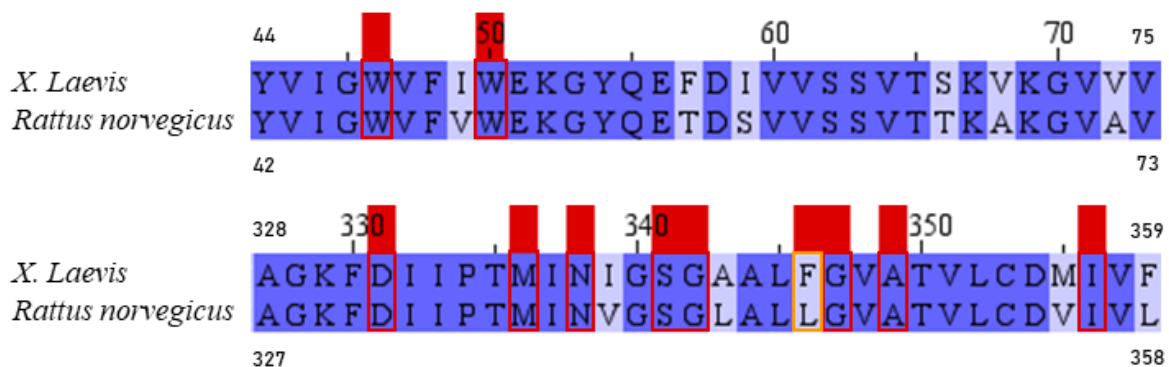


Figura 7. Alineamiento P2X4 en *Xenopus laevis* y Rata en sus en dominios transmembrana.

Alineamiento de la región transmembrana de la secuencia del receptor purinérgico P2X4, coloreado según el grado de conservación, donde los residuos que tienen 100% de identidad, están coloreados azul, mientras que los residuos semiconservados se muestran en una tonalidad de celeste. Los recuadros rojos se destacan los residuos que coinciden y han sido validados en modelos funcionales de P2X4.

Latapiat identifica los residuos de TRP46, TRP50, ASP331, MET336 como residuos encargados de la unión de IVM al receptor, mientras que los residuos ASN338, SER341, LEU346, GLY347, ALA349, ILE356 encargados de la modulación. Dentro de estos residuos que interactúan con el ligando en los modelos realizados podemos identificar los siguientes: TRP48, MET337, ASN339, SER342 y GLY343.

Estos resultados nos confirman que P2X4 en *Xenopus laevis* tiene las características estructurales y energéticas para interactuar con IVM, modulando de manera alostérica positiva el canal, alterando el flujo de Ca²⁺.

Objetivo 2: "Caracterizar los efectos fenotípicos de IVM en estadios de neurulación y juveniles en *Xenopus Laevis*."

2. Uso de IVM en neurulación induce DTN.

Para evaluar los posibles efectos en las etapas tempranas de desarrollo embrionario, específicamente durante los estadios de neurulación (12,5-20) y renacuajo (40-45) (Fig. 8)

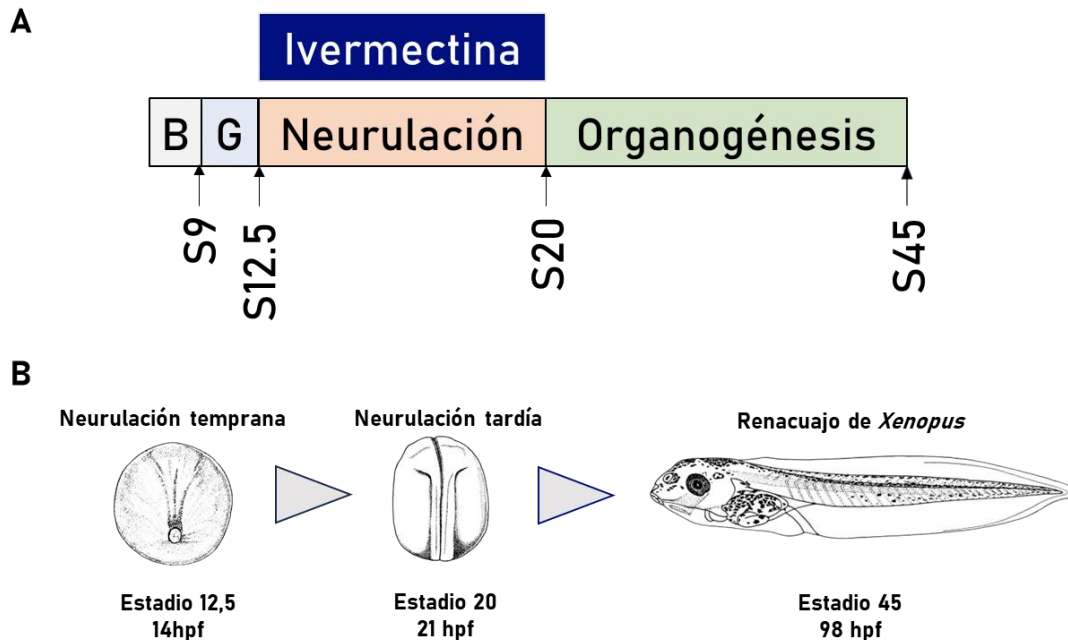


Figura 8. Esquemas de tratamiento farmacológico y estadios evaluados.

A. Esquema que representa la duración de los ensayos farmacológicos con ivermectina. **B.** Esquema referencial de los estadios estudiados junto con las horas post fertilización (hpf). B=Blastulación, G=Gastrulación. hpf= Horas post fertilización.

Los ensayos con IVM se realizaron en embriones en estadio 12,5 los cuales fueron incubados en concentraciones crecientes de IVM. Los embriones se trataron con este modulador alostérico positivo hasta alcanzar el estadio de neurula tardía (E20). Mostrando cambios morfológicos a partir de $1 \mu\text{M}$ (IVM). La exposición a IVM no parece afectar de manera inmediata el cierre del tubo neural, sin cambios con respecto a los controles (MMR y DMSO). Sin embargo, al observar los renacuajos (E45) usando tinción fluorescente (DAPI) y hematoxilina-eosina en cortes transversales, se pudo apreciar defectos de tubo neural abierto. Esta apertura se acentúa en la región anterior en comparación a la región posterior, en la cual comienza a normalizarse (Fig. 9).

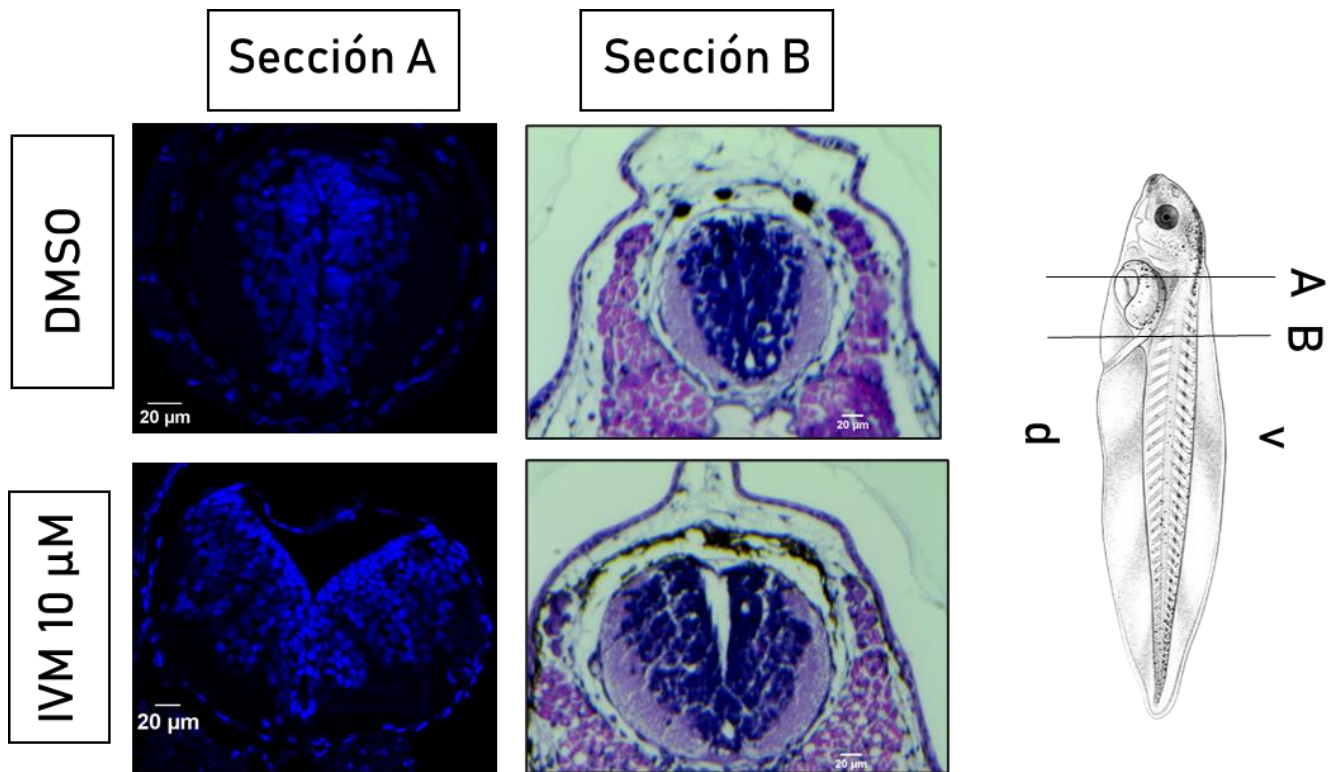


Figura 9. La exposición temprana a IVM causa una apertura completa del tubo neural.

Técnicas histológicas aplicadas en distintas cortes transversales. La sección **A** fueron procesadas inmunofluorescencia con DAPI. La región **B** fue procesada con hematoxilina-eosina. Los efectos pueden ser observados en la fila de 10 µM de IVM. El esquema de la derecha muestra donde ocurre cada sección de los cortes en *Xenopus laevis*. d: Dorsal. v: Ventral.

Al observar un fenotipo caudal alterado, existe una pigmentación mayor con respecto a los controles. Los tratados con 1 µM de IVM expresan un aumento de 1,4 veces la cantidad de melanocitos relativos en comparación a los controles ($26,80 \pm 3,355$), mientras que los tratados con 10 µM de IVM expresan 1,7 veces ($49,60 \pm 10,02$) la cantidad de melanocitos relativos. Simultáneamente, los renacuajos tratados con 1 µM presentan un aumento de 2,4 veces el volumen de los melanocitos en la región interocular ($28,70 \pm 9,647$ mm), mientras que los renacuajos tratados con 10 µM, presentan 5 veces el volumen de los melanocitos en la región interocular ($80,90 \pm 5,270$ mm) en comparación a los controles. Además, se presentan melanocitos ectópicos (Fig. 10).

A

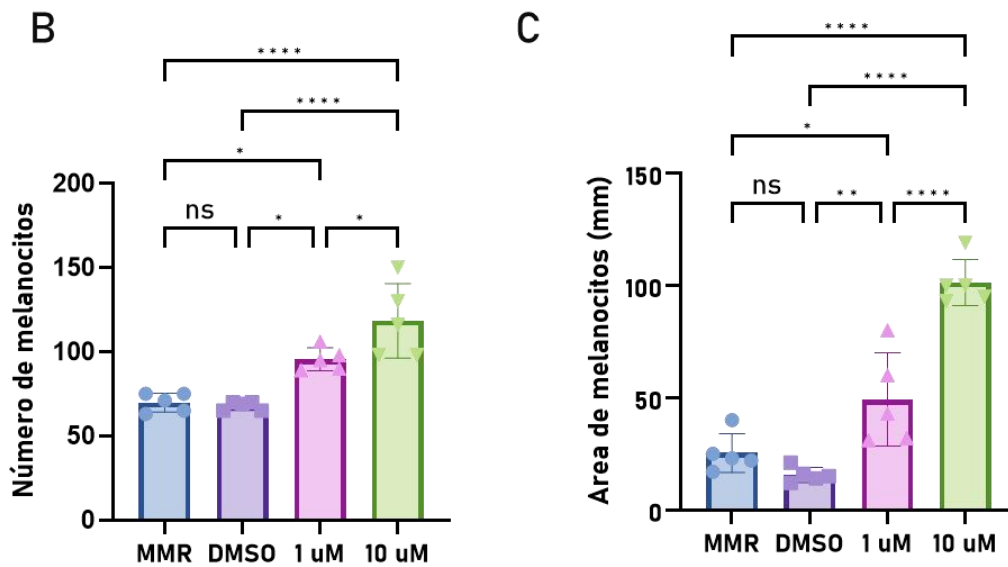
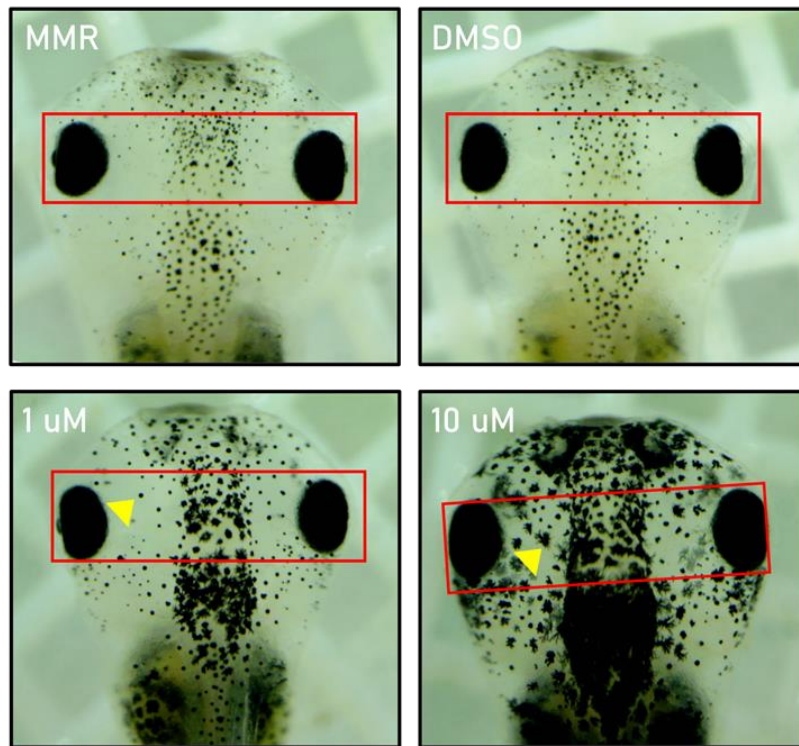


Figura 10. La exposición temprana a IVM induce un incremento en el tamaño y proliferación de melanocitos.

Renacuajos de estadio 45 expuestos a distintas concentraciones de IVM durante los estadios 12,5-20 muestran una apariencia más oscura comparada a los controles (MMR/DMSO). Melanocitos ectópicos señalados con flechas amarillas. La cantidad de melanocitos fue contada desde la región interocular (caja roja) y graficada en B y C, N= 5 ANOVA de una vía corrección

de Dunnett (* $P < 0.05$; **** $P < 0,0001$; ns= no significativo) Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.

Para evaluar la movilidad de los renacuajos, se midió la capacidad sensorial, tocándoles la cola con una punta de metal en la cola, midiendo el reflejo de escape (Roberts, 1990). También se identificó el comportamiento que tienen los renacuajos sin un estímulo sensorial, es decir, su comportamiento basal (Jamieson & Roberts, 2000) y compararlos con los controles. Los controles muestran un reflejo de escape normal cuando eran tocados con la punta de metal, mientras que los tratados con $1 \mu\text{M}$ de IVM presentan alteraciones en la movilidad (69%) y en algunos casos parálisis total (12%), mientras que los tratados con $10 \mu\text{M}$ de IVM presentaron en su gran mayoría parálisis y sin respuesta a estímulos (92%) y en menor proporción una movilidad de tipo reducida (8%) (Fig. 11).

Paralización en embriones tratados con IVM

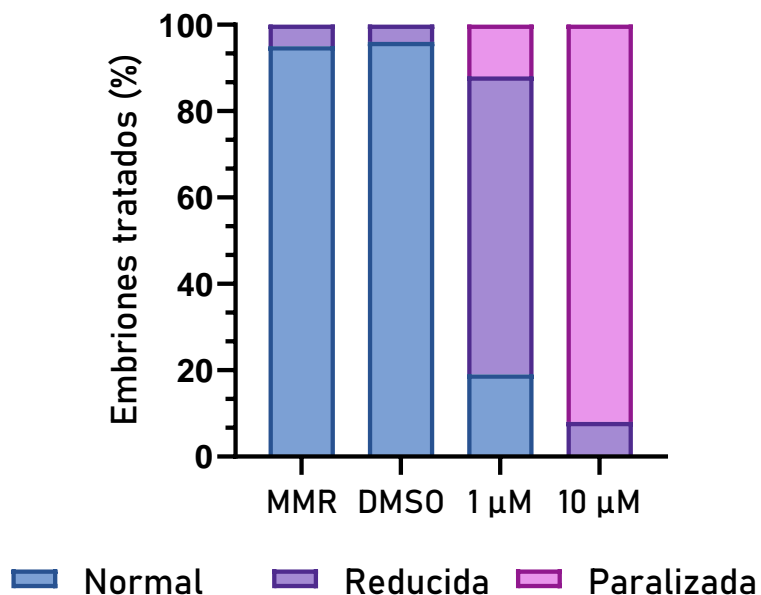


Figura 11. Caracterización de movilidad en renacuajos E45 en distintas condiciones de tratamiento.

El gráfico de barras apiladas caracterizando el comportamiento de los renacuajos en las condiciones de tratamiento control (MMR/DMSO) y tratamiento (1 µM y 10 µM) N=10, 10 por condición.

Estos resultados confirman que la exposición a IVM durante la etapa de neurulación producen alteraciones al desarrollo de estadios juveniles.

Objetivo 3: “Evaluar la presencia y niveles de expresión de factores de transcripción involucrados en la diferenciación de motoneuronas en embriones de *Xenopus* tratados con IVM.”

3. Perfil de expresión de FTs en renacuajos de *Xenopus laevis*.

Los renacuajos (E45) expresan NCAM, NKX6.1 y Mnx1. En esta etapa se caracterizó la expresión de estos factores de transcripción en las condiciones controles (MMR y DMSO) y tratados con IVM (1 y 10 μ M), a través de qRT-PCR. Los resultados evidencian la expresión de NCAM, NKX6.1 y Mnx1 (Fig. 12A). Los patrones de migración electroforéticos y las curvas de disociación observadas en las distintas condiciones son similares entre sí, demostrando especificidad de los partidores reportados en la tabla 1, mostrando un solo pico de disociación (Fig. 13). Los factores de transcripción NCAM, NKX 6.1 y Mnx1 no mostraron patrón de expresión o cambios significativos (aumento o disminución de niveles de mensajero) (Fig. 12A). Para la cuantificación por RT-qPCR de los factores de transcripción, se determinó el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación al gen de referencia Sub-1 (Mughal et al., 2018). Los resultados fueron expresados aplicando el método Δ Ct en el cual la cantidad de ADNc fue expresada como X veces sobre la muestra utilizada como referencia Sub1- (Mughal et al., 2018) y posteriormente se implementó el método $\Delta\Delta$ Ct, normalizando los datos a la condición de DMSO (Fig. B12). El Ct es inversamente proporcional al número de copias del templado, lo que indica que, a mayor número de copias de templado, menor Ct medido. El análisis de RT-qPCR evidenció que estos factores de transcripción mantienen su expresión bajo las distintas condiciones cuando son tratados con IVM.

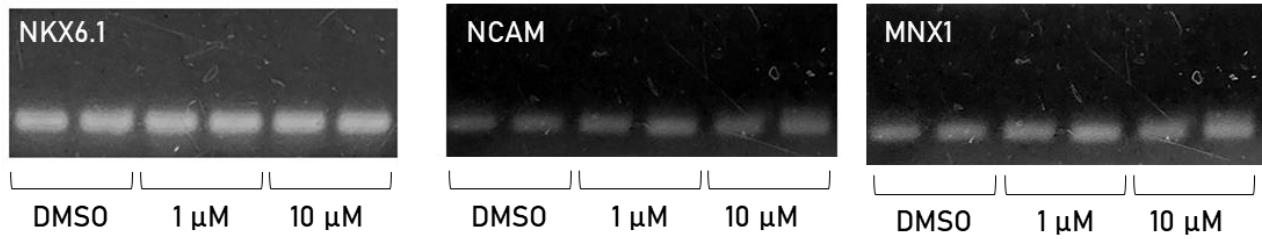
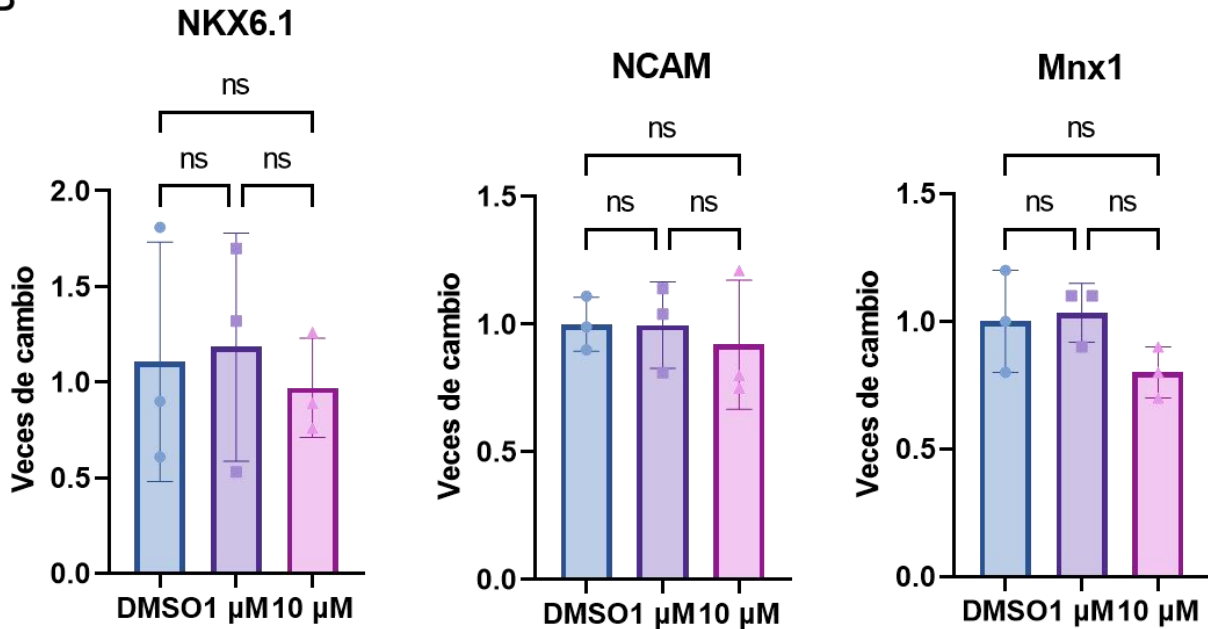
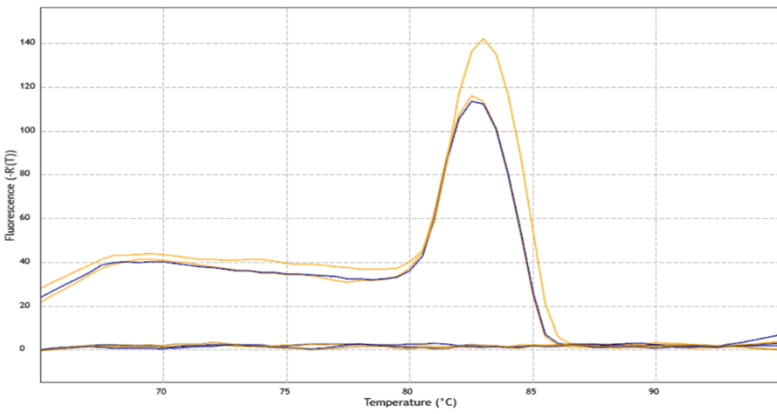
A**B**

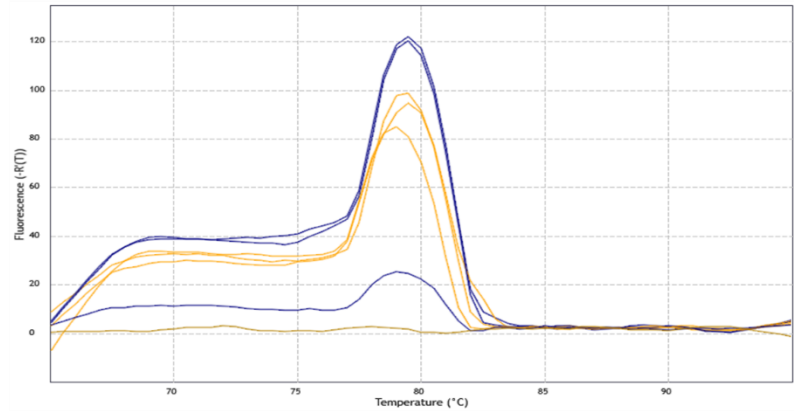
Figura 12. Expresión relativa de factores de transcripción en distintas condiciones.

A. Expresión de patrones migratorios electroforéticos en distintas condiciones de tratamiento farmacológico. Carril 1 y 2. DMSO (dimetilsulfóxido, E45), Carril 3 y 4 1 μM (1 μM de IVM, E45), Carril 5 y 6 10 μM (10 μM de IVM, E45) N=3. **B.** RT-qPCR para NKX 6.1, NCAM y Mnx1 en las condiciones DMSO, 1 μM y 10 μM de IVM. N=3. La expresión transcripcional de los factores de transcripción fue normalizada al gen control sub-1. ANOVA de una vía, corrección de Dunnett, (ns=no significativo). Las barras de error para los datos representan la desviación estándar.

Melt Curve - Raw/Derivative Curve NKX6.1



Melt Curve - Raw/Derivative Curve NCAM



Melt Curve - Raw/Derivative Curve Mnx1

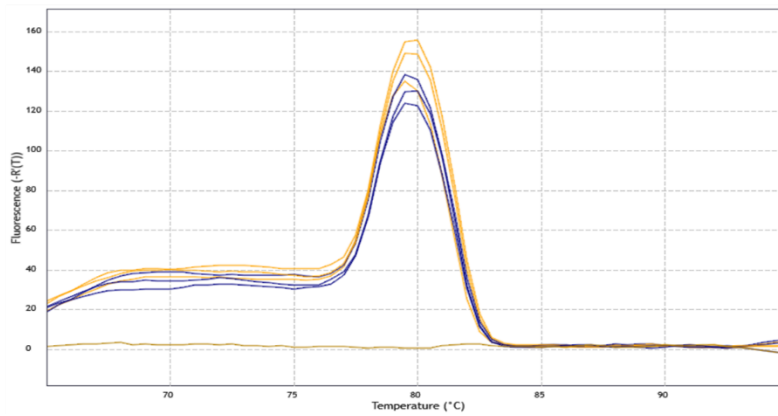


Figura 13. Curva de disociación de factores de transcripción.

Curvas de disociación de los factores NKX 6.1, NCAM y Mnx1 evidenciando la especificidad de los partidores mediante un solo pico de fluorescencia en una temperatura específica.

Objetivo 4: “Evaluar la organización estructural (Receptores de AChRs, músculo) de la unión neuromuscular de embriones de *Xenopus laevis* tratados con IVM durante la Neurulación.”

4.1 Expresión de la unión neuromuscular mediante *Whole-Mount* en renacuajos.

En primera instancia, se analizaron los controles buscando diferencias morfológicas entre las estructuras que se visualizaron. Solo los AChRs pudieron ser detectados a través de la señal fluorescente, mientras que el neurofilamento solo permitió marcar el fondo (músculos) y DAPI no fue detectada señal, por lo que no se tomó el canal para la obtención de las fotos (Fig. 14). Posteriormente se seleccionaron los receptores de acetilcolina que se encuentran entre los chebrones 7 y 8 del área dorsal y anterior para cuantificar el área e intensidad con un aumento de 40X tanto de la condición control DMSO y del tratamiento con 10 μ M de IVM (Fig. 15A). Los resultados mostraron una diferencia significativa entre el área de los embriones con DMSO y 10 μ M ($3,774 \pm 0,9277$), mientras que la intensidad muestra una tendencia a disminuir en los embriones tratados con 10 μ M de IVM (Fig. 15B). Además, en la zona anterior ventral se puede apreciar este efecto agravado (Fig. 14).

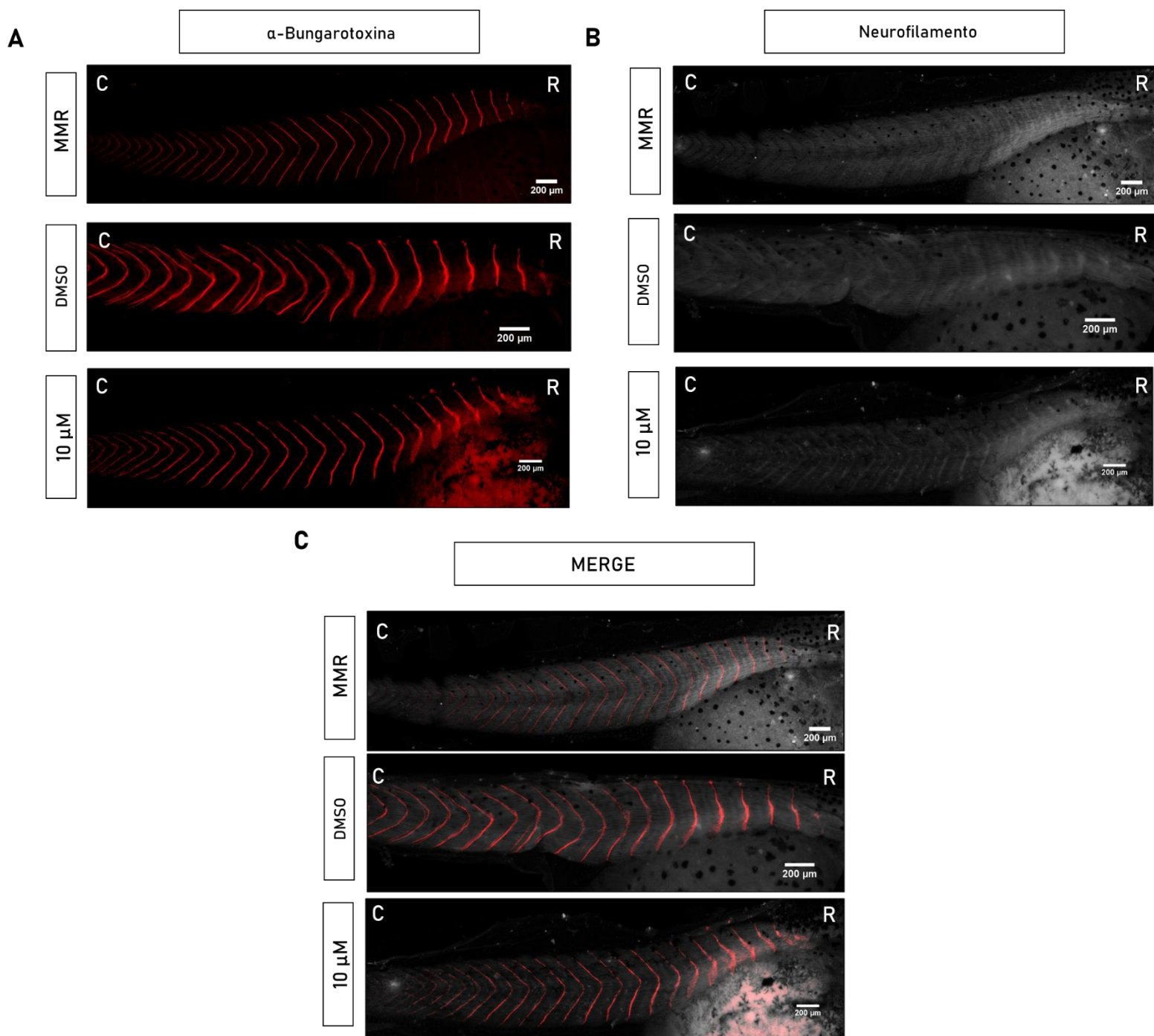


Figura 14. Micrografías longitudinales en la sección caudal de *Xenopus laevis*.

Micrografías agrupadas mostrando longitudinalmente la sección de la cola de *Xenopus laevis* en estadio 45 en las condiciones control (MMR y DMSO) y tratamiento de 10 μM de IVM. **A.** Micrografías agrupadas comparando las distintas condiciones agrupadas marcando receptores de acetilcolina. **B.** Micrografías agrupadas comparando las distintas condiciones marcando musculo. **C.** Unión de los canales en una misma imagen, agrupando las micrografías para comparar las señales entre las distintas condiciones. R: Rostral, C: Caudal

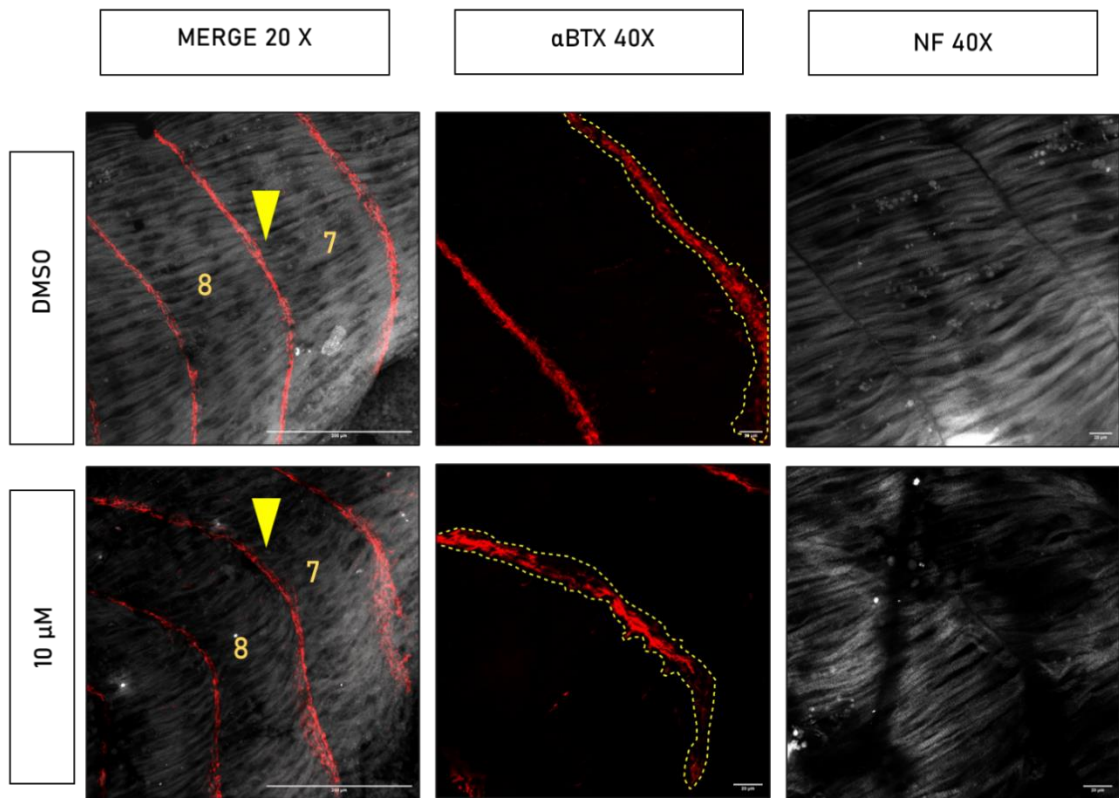
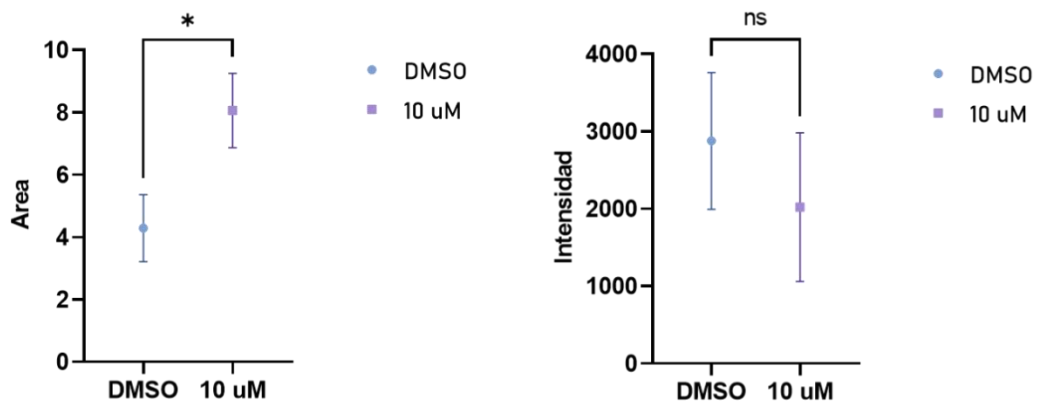
A**B**

Figura 15. Comparación de α -Bungarotoxina y músculo en chebrones de *Xenopus laevis*.

A. Micrografías de la unión de los canales con 20X de aumento, enumerando los chebrones y señalando con flechas amarillas los receptores de acetilcolina que fueron cuantificados con aumento 40X, señalando que área fue medida. **B.** Análisis comparativo que muestra las diferencias entre el área e intensidad de los receptores cuantificados. N=3 t-test con corrección de Welch's (*= $P < 0.05$, ns=no significativo) Las barras de error para los datos representan la desviación estándar. α BTX: Alfa-bungarotoxina, NF: Neurofilamento. MERGE: Unión de los canales en una misma imagen.

4.2. Expresión de la unión neuromuscular mediante cortes histológicos y tinción hematoxilina-eosina.

Al igual que todos los cordados, *Xenopus laevis* cuenta con segmentos musculares metaméricos para desarrollar su locomoción. Estos músculos son llamados miotomos y tienen una forma característica en especies acuáticas como es el renacuajo de *Xenopus laevis* antes de la metamorfosis (Rost et al., 2014). Esta forma es conocida como “chebrón” o “chevron” en inglés, puesto que describe la disposición en forma de “V” de las fibras musculares observadas (Kimmel et al., 1995).

En nuestros resultados, el músculo en presencia de tratamientos farmacológicos con IVM durante neurulación se aprecia desorganizado en comparación al control, este efecto se puede apreciar de mejor manera en los cortes longitudinales de 6 μm . Mostrando una vacuolización (8.6x), con respecto a los controles. Expresando una diferencia en la forma y distribución de los núcleos (Hematoxilina), mostrando que en las condiciones tratadas aparece una mayor cantidad de núcleos por chebrón, así como también un alargamiento en estos (Fig. 16).

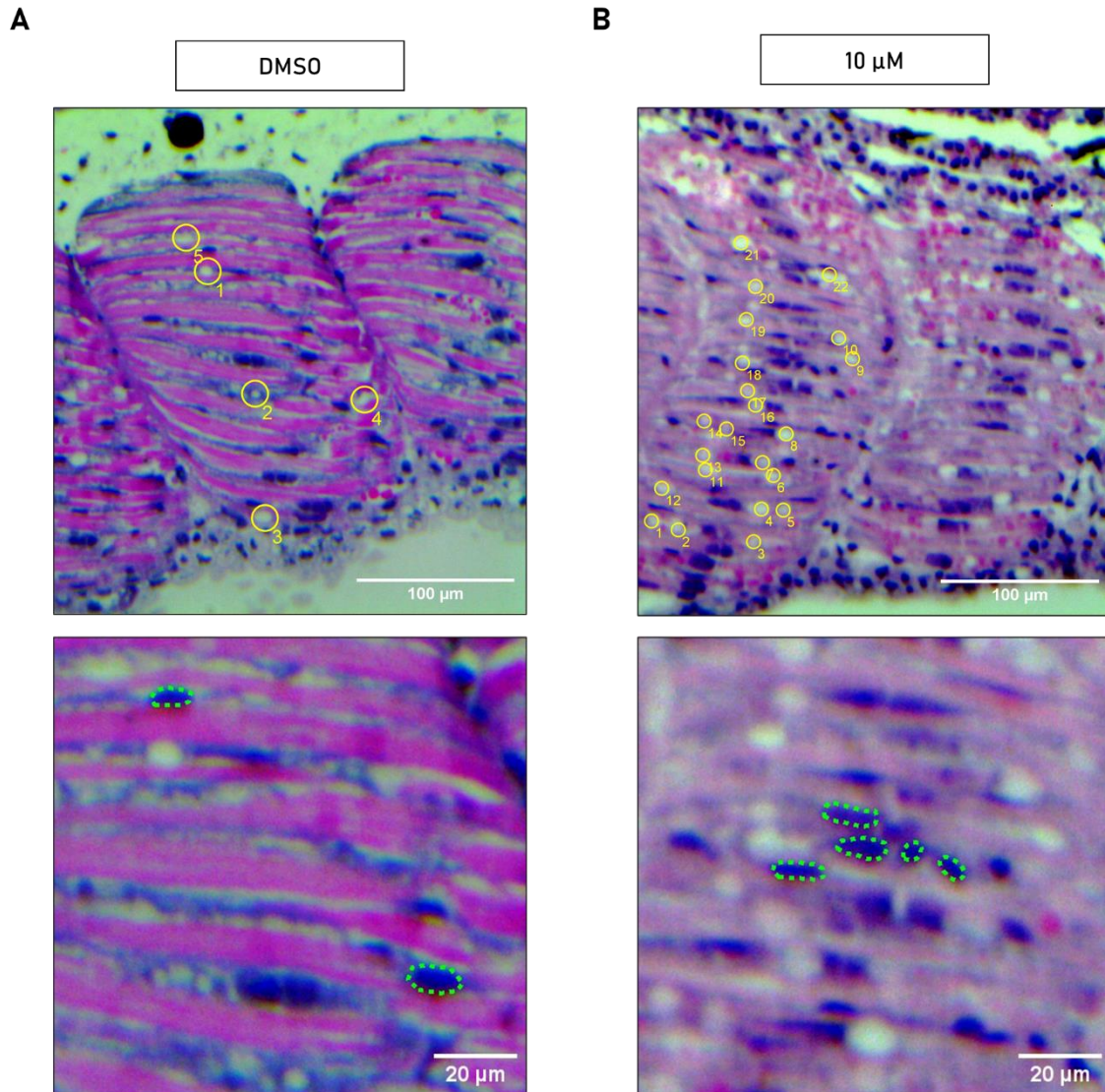


Figura 16. Tinción con hematoxilina-eosina en cortes longitudinales de *Xenopus laevis*.

A. (Panel superior) Foto de fibra muscular de control DMSO, enumerando vacuolación. (Panel inferior) Zoom digital a fibra muscular de control DMSO, marcando con líneas discontinuas verde núcleos. **B.** Foto de fibra muscular de embrión tratado con 10 μM de IVM. (Panel inferior) Zoom digital a fibra muscular de embrión tratado con 10 μM de IVM, marcando con líneas discontinuas verde núcleos.

V. DISCUSIÓN

1.- Presencia y rol de P2X4, señalización purinérgica.

La activación de receptores purinérgicos mediante purinas, regulan diversas funciones celulares en animales, cumpliendo funciones como la transmisión sináptica, neuromodulación, entre otras (Rotermund et al., 2019). El receptor P2X4 en vertebrados cubre un papel central dentro del control en las vías de neurotransmisión, como son la activación sensorimotora, interacciones sociales y consumo de alcohol, además de presentar un rol en inflamación, expresándose preferentemente en lisosomas (Suurväli et al., 2017). Estos receptores también se expresan durante el desarrollo embrionario de murinos, pues mediante RT-PCR es posible encontrar transcritos del receptor P2X4 en el cerebro desde el día embrionario 14, terminando la neurulación. Sin embargo, no es observado mediante inmunoreactividad hasta etapas postnatales (Cheung et al., 2005), Mientras que en *Xenopus laevis* es posible encontrar sus transcritos en todos los estadios de embriogénesis desde el clivaje, gastrulación, neurulación y organogénesis (Blanchard et al., 2019). Nuestros resultados demuestran la expresión del receptor P2X4 durante la neurulación de manera constante (E12.5-20) (Fig.4) otorgándole un posible rol funcional durante este proceso. Además, P2X4 de *Xenopus laevis* mantiene las propiedades para ser modulado alostéricamente por IVM, nuestro compuesto de interés, lo cual fue predicho mediante modelos teóricamente generados a partir de la estructura de pez cebra. Estas predicciones computacionales se correlacionan directamente con la información funcional disponible en estudios electrofisiológicamente realizados con mutantes de P2X4 en ratas ((Latapiat et al., 2017), confirman su capacidad de interacción con IVM, esto cobra relevancia al considerar que P2X4 corresponde al receptor con mayor conservación entre los receptores P2X durante la evolución de vertebrados (Blanchard et al., 2019). La localización del receptor en el embrión continúa siendo incierta, por lo que se sugiere la realización de experimentos de inmunodetección en embrión completo o cortes, como los realizados en la parte 4 de los resultados en este trabajo, con el fin de identificar la ubicación del receptor para entender mejor sus posibles mecanismos de acción dentro de la neurulación.

2. El uso de IVM durante la neurulación causa efectos en etapa larval.

Si bien los efectos de IVM sobre los embriones no son apreciables en los estadios de neurulación, es posible observarlos cuando llegan a estadios de larva o renacuajo (E45), manifestándose con una apertura total del tubo neural en la zona anterior de los renacuajos, mientras que hacia la región caudal parece cerrarse normalmente. Esto estaría relacionado con el inicio del cierre del tubo neural el cual comienza desde la región posterior hacia la anterior (Suzuki et al., 2017). Debido al cierre superficial (epitelial) del tubo neural, es necesario realizar cortes histológicos transversales a los embriones tratados en distintas etapas de la neurulación para identificar en qué momento se altera el cierre del tubo.

Adicionalmente, la proliferación y migración de los melanocitos se ve significativamente alterada en la presencia de IVM, sugiriendo una alteración directa al sistema nervioso durante su formación al ser las células precursoras provenientes directamente de las crestas neurales (Cichorek et al., 2013). Otros grupos de investigación reportan efectos similares, sin embargo, proponen un mecanismo de acción que se desencadenaría en etapas más avanzadas del desarrollo embrionario, específicamente, la unión y modulación de IVM a canales de cloruro activados por glicina, atribuyendo la parálisis a un efecto de despolarización de membrana debido a este aumento de pigmentación (Blackiston et al., 2011; Hutchison et al., 2024).

Nuestros resultados evidencian un efecto concentración-respuesta, mostrando que la concentración de 1 μ M de IVM presenta una mayor cantidad de melanocitos que los controles, pero menor que los tratados con 10 μ M, similar al efecto en movilidad, donde los embriones tratados con 1 μ M pierden movilidad, sin embargo, no quedan paralizados, como los tratados con 10 μ M de IVM. Considerando los defectos registrados que evidencian la presencia de un tubo neural abierto, se podría sugerir una alteración en la diferenciación y migración de las células encargadas del desarrollo del sistema locomotor provenientes de la zona anterior-dorsal a células de pigmentación, lo que explicaría el aumento en el número de melanocitos y su aparición de manera ectópica como también la disminución significativa de la actividad motora en los renacuajos en estadio 45.

3. Factores de transcripción y cambios morfológicos.

Los factores de transcripción trabajan en conjunto para la conformación y mantención de motoneuronas, por lo que un cambio en su expresión podría significar diferencias en cómo se establece y funciona la unión neuromuscular. Los resultados no arrojaron una diferencia significativa en las condiciones tratadas con respecto a los controles, sin embargo, muestran una tendencia a disminuir su expresión en los embriones tratados con 10 μM de IVM, por lo que es necesario realizar más experimentos, intentado reducir la variabilidad entre resultados y consolidar si existe una tendencia. Sin embargo, dentro de los 8 factores transcripción mencionados en el marco teórico, solo se evaluó la presencia y veces de cambio de 2 además de una molécula de adhesión neural, por lo que el estudio debería complementarse evaluando la presencia y cambio del resto de FTs mencionados.

Por otra parte, debido a que no fue posible identificar la expresión mediante inmunohistoquímica de neurofilamento en los controles, no pudieron ser evaluada la conformación de las terminaciones nerviosas, pero sí pudo ser identificado diferencias en las fibras musculares mostrando cambios en los receptores de acetilcolina que involucran un aumento en el área que abarca la placa terminal motora como también una disminución en la intensidad de la señal fluorescente asociada a los receptores. Estos cambios cuando se observan en murinos corresponden a denervación y pérdida de la función en la unión neuromuscular (Deschenes et al., 2010; Guzzini et al., 2008).

Ante la dificultad de observar los axones motores, la falta de movimiento en los embriones no se puede asegurar que corresponda a una denervación. En *Xenopus laevis*, parece existir una relación directa entre el desarrollo del SNC y el desarrollo normal del patrón muscular (Herrera-Rincon et al., 2017), por lo que la alteración durante la formación de este podría repercutir, expresando los resultados obtenidos en las fibras musculares de los embriones tratados con ivermectina. Sin embargo, estos estudios son llevados a cabo durante períodos más largos y el uso de otras drogas además de ivermectina (Lobikin et al., 2015). La presencia de vacuolas sugiere que podría presentarse un fenómeno similar a la enfermedad de Danon, en la que ocurre una disfunción en el proceso de autofagia asociada a los lisosomas, causando atrofia y vacuolización en las fibras musculares (Fanin et al., 2008). Adicionalmente, se aprecian diferencias en los micronúcleos musculares de los embriones, si bien en humanos parece no importar la forma de los núcleos en las fibras musculares esqueléticas, en roedores se considera que los mionúcleos en fibras de contracción rápida son elípticos y multinucleados (Qaisar &

Larsson, 2014), como los expresados en los embriones tratados con ivermectina (Fig. 16), mientras que en los controles presentan sólo un núcleo por fibra, con una apariencia más redondeada, típica de mionúcleo perteneciente a fibra de contracción lenta como los que se presentan en pez cebra (Liew et al., 2008; Roy et al., 2001). Debido a que la ubicación del receptor es incierta, esto último podría estar relacionado con una alteración en las células precursoras de musculo estriado posiblemente dependientes de P2X4 durante neurulación pertenecientes al tejido mesodermal el embrión.

En resumen, el desarrollo de esta tesis permitió demostrar la expresión de P2X4 en *Xenopus laevis* durante neurulación, sugiriendo que los efectos que produce ivermectina durante esta etapa, ocurren debido a la modulación de receptores purinérgicos P2X4, que fueron evaluados a través de herramientas bioinformáticas. Se caracterizó la pigmentación, movimiento, cambios en las estructuras observables de la unión neuromuscular y tipo de nucleación en lo renacuajos a causa de IVM. En relación a nuestra hipótesis, esta sería rechazada, debido a que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de factores de transcripción mencionado. Por ello, nuestros resultados establecen un mecanismo de acción para los efectos de IVM a través de la alteración de concentraciones de calcio por la modulación de los receptores P2X4, fortaleciendo la hipótesis de la existencia de señalización purinérgica durante la embriogénesis.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aquino-Canchari CR, Vittes-Lázaro AE. Oncocercosis, the rivers blindness that continue affecting Latin America. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2020;39(1):1-3.
- Arber, Silvia, Barbara Han, Monica Mendelsohn, Michael Smith, Thomas M Jessell, y Shanthini Sockanathan. «Requirement for the Homeobox Gene Hb9 in the Consolidation of Motor Neuron Identity». *Neuron* 23, n.º 4 (agosto de 1999): 659-74. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)80026-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)80026-X).
- Bermedo-García, Francisca, Jorge Ojeda, Emilio E. Méndez-Olivos, Sylvain Marcellini, Juan Larraín, y Juan Pablo Henríquez. «The neuromuscular junction of *Xenopus* tadpoles: Revisiting a classical model of early synaptogenesis and regeneration». *Mechanisms of Development* 154 (1 de diciembre de 2018): 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.05.008>.
- Blackiston, Douglas, Dany S. Adams, Joan M. Lemire, Maria Lobikin, y Michael Levin. «Transmembrane potential of GlyCl-expressing instructor cells induces a neoplastic-like conversion of melanocytes via a serotonergic pathway». *Disease Models & Mechanisms* 4, n.º 1 (1 de enero de 2011): 67-85. <https://doi.org/10.1242/dmm.005561>.
- Blanchard, Camille, Eric Boué-Grabot, y Karine Massé. «Comparative Embryonic Spatio-Temporal Expression Profile Map of the *Xenopus* P2X Receptor Family». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13 (26 de julio de 2019): 340. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00340>.
- Borodinsky, Laura N. «*Xenopus Laevis* as a Model Organism for the Study of Spinal Cord Formation, Development, Function and Regeneration». *Frontiers in Neural Circuits* 11 (23 de noviembre de 2017). <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00090>.
- Castro, Patricio A., Ingrid Pinto-Borguero, Gonzalo E. Yévenes, Gustavo Moraga-Cid, y Jorge Fuentealba. «Antiseizure medication in early nervous system development. Ion channels and synaptic proteins as principal targets». *Frontiers in Pharmacology* 13 (14 de octubre de 2022): 948412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.948412>.
- Cheung, K.K., W.Y. Chan, y G. Burnstock. «Expression of P2X Purinoceptors during Rat Brain Development and Their Inhibitory Role on Motor Axon Outgrowth in Neural Tube Explant Cultures». *Neuroscience* 133, n.º 4 (enero de 2005): 937-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.032>.
- Choudhry, Zia, Azadeh A. Rikani, Adnan Maqsood Choudhry, Sadaf Tariq, Fozia Zakaria, Muhammad Waheed Asghar, Muhammad Khan Sarfraz, Kamran Haider, Afia Ansar Shafiq, y Nusrat Jahan Mobassarrah. «Sonic Hedgehog Signalling Pathway: A Complex Network». *Annals of Neurosciences* 21, n.º 1 (1 de enero de 2014). <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210109>.

- Cichorek, Mirosława, Malgorzata Wachulska, y Aneta Stasiewicz. «Heterogeneity of Neural Crest-Derived Melanocytes». *Open Life Sciences* 8, n.º 4 (1 de abril de 2013): 315-30. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0141-1>.
- Dale, Nicholas. «Dynamic ATP Signalling and Neural Development». *The Journal of Physiology* 586, n.º Pt 10 (5 de mayo de 2008): 2429. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.152207>.
- Danesin, Cathy, y Cathy Soula. «Moving the Shh Source over Time: What Impact on Neural Cell Diversification in the Developing Spinal Cord?» *Journal of Developmental Biology* 5, n.º 2 (12 de abril de 2017): 4. <https://doi.org/10.3390/jdb5020004>.
- Dasen, Jeremy S., Alessandro De Camilli, Bin Wang, Philip W. Tucker, y Thomas M. Jessell. «Hox Repertoires for Motor Neuron Diversity and Connectivity Gated by a Single Accessory Factor, FoxP1». *Cell* 134, n.º 2 (julio de 2008): 304-16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.019>.
- De Marco Garcia, Natalia V., y Thomas M. Jessell. «Early Motor Neuron Pool Identity and Muscle Nerve Trajectory Defined by Postmitotic Restrictions in Nkx6.1 Activity». *Neuron* 57, n.º 2 (enero de 2008): 217-31. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.033>.
- Deschenes, Michael R., Mackenzie A. Roby, Margaret K. Eason, y M. Brennan Harris. «Remodeling of the Neuromuscular Junction Precedes Sarcopenia Related Alterations in Myofibers». *Experimental Gerontology* 45, n.º 5 (mayo de 2010): 389-93. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.007>.
- Dessaud, Eric, Andrew P. McMahon, y James Briscoe. «Pattern Formation in the Vertebrate Neural Tube: A Sonic Hedgehog Morphogen-Regulated Transcriptional Network». *Development* 135, n.º 15 (1 de agosto de 2008): 2489-2503. <https://doi.org/10.1242/dev.009324>.
- Diazgranados-Sanchez, J. A., J. L. Mejia-Fernandez, L. S. Chan-Guevara, M. H. Valencia-Artunduaga, y J. L. Costa. «[Ivermectin as an adjunct in the treatment of refractory epilepsy]». *Revista De Neurologia* 65, n.º 7 (1 de octubre de 2017): 303-10.
- Dichmann, Darwin S., y Richard M. Harland. «Nkx6 Genes Pattern the Frog Neural Plate and Nkx6.1 Is Necessary for Motoneuron Axon Projection». *Developmental Biology* 349, n.º 2 (enero de 2011): 378-86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.10.030>.
- Drugs.com [Internet]. 2000-2022. Ivermectin Tablets-FDA prescribing information, side effects and uses from Drugs.com; [Updated: 1 March 2022, Cited: 9 July 2022]. Available from: <https://www.drugs.com/prednisone.html>.
- Eberhardt, Jerome, Diogo Santos-Martins, Andreas F. Tillack, y Stefano Forli. «AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings».

Journal of Chemical Information and Modeling 61, n.º 8 (23 de agosto de 2021): 3891-98. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>.

Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U., & Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics*, Chapter 5, Unit-5.6. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s15>

Eswar, Narayanan, Ben Webb, Marc A. Marti-Renom, M.S. Madhusudhan, David Eramian, Min-yi Shen, Ursula Pieper, y Andrej Sali. «Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller». *Current Protocols in Bioinformatics* 15, n.º 1 (septiembre de 2006). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s15>.

Eynard, Aldo R., Mirta A. Valentich, y Roberto A. Rovasio. *Histología y Embriología del ser humano*. Ed. Médica Panamericana, 2008.

Fanin, Marina, Anna Nascimbeni, Marco Spinazzi, Lucia Nardetto, y Corrado Angelini. «Recent findings in Danon disease, a rare X-linked dominant disorder with multisystem involvement.», 291-309, 2008.

Frey, Lauren, y W. Allen Hauser. «Epidemiology of Neural Tube Defects». *Epilepsia* 44, n.º s3 (junio de 2003): 4-13. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.44.s3.2.x>.

Gaufo, Gary O., Kirk R. Thomas, y Mario R. Capecchi. «Hox3 Genes Coordinate Mechanisms of Genetic Suppression and Activation in the Generation of Branchial and Somatic Motoneurons». *Development* 130, n.º 21 (1 de noviembre de 2003): 5191-5201. <https://doi.org/10.1242/dev.00730>.

Gohlke, H., Hendlich, M., & Klebe, G. (2000). Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *Journal of molecular biology*, 295(2), 337-356.

Gohlke, Holger, Manfred Hendlich, y Gerhard Klebe. «Knowledge-Based Scoring Function to Predict Protein-Ligand Interactions». *Journal of Molecular Biology* 295, n.º 2 (enero de 2000): 337-56. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3371>.

Guzzini, Matteo, Salvatore Raffa, Stefano Geuna, Silvia Nicolino, Maria Rosaria Torrisi, Pierluigi Tos, Bruno Battiston, Francesca Grassi, y Andrea Ferretti. «Denervation-Related Changes in Acetylcholine Receptor Density and Distribution in the Rat Flexor Digitorum Sublimis Muscle». *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia* 113, n.º 4 (2008): 209-16.

H, Blencowe, Kancherla V, Moorthie S, Darlison Mw, y Modell B. «Estimates of Global and Regional Prevalence of Neural Tube Defects for 2015: A Systematic Analysis». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1414, n.º 1 (febrero de 2018). <https://doi.org/10.1111/nyas.13548>.

- Hattori, M., Gouaux, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485, 207–212 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11010>
- Hattori, Motoyuki, y Eric Gouaux. «Molecular Mechanism of ATP Binding and Ion Channel Activation in P2X Receptors». *Nature* 485, n.º 7397 (mayo de 2012): 207-12. <https://doi.org/10.1038/nature11010>.
- Heidary, Fatemeh, y Reza Gharebaghi. «Ivermectin: A Systematic Review from Antiviral Effects to COVID-19 Complementary Regimen». *The Journal of Antibiotics* 73, n.º 9 (septiembre de 2020): 593-602. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0336-z>.
- Herrera-Rincon, Celia, Vaibhav P. Pai, Kristine M. Moran, Joan M. Lemire, y Michael Levin. «The Brain Is Required for Normal Muscle and Nerve Patterning during Early *Xenopus* Development». *Nature Communications* 8, n.º 1 (25 de septiembre de 2017): 587. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00597-2>.
- Honorato, Rodrigo V., Panagiotis I. Koukos, Brian Jiménez-García, Andrei Tsaregorodtsev, Marco Verlato, Andrea Giachetti, Antonio Rosato, y Alexandre M. J. J. Bonvin. «Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem». *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (28 de julio de 2021): 729513. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.729513>.
- Hutchison, Ainsley, Chiedza Sibanda, Mackenzie Hulme, Sarah Anwar, Bengisu Gur, Rachael Thomas, y Laura Anne Lowery. «Re-examining the evidence that ivermectin induces a melanoma-like state in *Xenopus* embryos». *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 46, n.º 1 (enero de 2024): e2300143. <https://doi.org/10.1002/bies.202300143>.
- J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Jamieson, D., y A. Roberts. «Responses of Young *Xenopus Laevis* Tadpoles to Light Dimming: Possible Roles for the Pineal Eye». *The Journal of Experimental Biology* 203, n.º Pt 12 (junio de 2000): 1857-67. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.12.1857>.
- Jamieson, D., y Alan Roberts. «Responses Of Young *Xenopus Laevis* Tadpoles To Light Dimming: Possible Roles For The Pineal Eye». *Journal of Experimental Biology* 203, n.º 12 (15 de junio de 2000): 1857-67. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.12.1857>.
- Jelínková, Irena, Vojtech Vávra, Marie Jindrichova, Tomas Obsil, Hana W. Zemkova, Hana Zemkova, y Stanko S. Stojilkovic. «Identification of P2X4 Receptor Transmembrane Residues Contributing to Channel Gating and Interaction with Ivermectin». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 456, n.º 5 (agosto de 2008): 939-50. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0450-4>.

- Jelínková, Irena, Zonghe Yan, Zhaodong Liang, Sachin Moonat, Jan Teisinger, Stanko S. Stojilkovic, y Hana Zemková. «Identification of P2X4 Receptor-Specific Residues Contributing to the Ivermectin Effects on Channel Deactivation». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349, n.º 2 (octubre de 2006): 619-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.084>.
- Jelínková, Irena, Zonghe Yan, Zhaodong Liang, Sachin Moonat, Jan Teisinger, Stanko S. Stojilkovic, y Hana Zemková. «Identification of P2X4 Receptor-Specific Residues Contributing to the Ivermectin Effects on Channel Deactivation». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349, n.º 2 (octubre de 2006): 619-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.084>.
- Jessell, Thomas M. «Neuronal Specification in the Spinal Cord: Inductive Signals and Transcriptional Codes». *Nature Reviews Genetics* 1, n.º 1 (octubre de 2000): 20-29. <https://doi.org/10.1038/35049541>.
- Khakh, B. S., G. Burnstock, C. Kennedy, B. F. King, R. A. North, P. Séguéla, M. Voigt, y P. P. Humphrey. «International Union of Pharmacology. XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X Receptors and Their Subunits». *Pharmacological Reviews* 53, n.º 1 (marzo de 2001): 107-18.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, y Thomas F. Schilling. «Stages of Embryonic Development of the Zebrafish». *Developmental Dynamics* 203, n.º 3 (julio de 1995): 253-310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Laskowski, Roman A., y Mark B. Swindells. «LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery». *Journal of Chemical Information and Modeling* 51, n.º 10 (24 de octubre de 2011): 2778-86. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>.
- Latapiat, Verónica, Felipe E. Rodríguez, Francisca Godoy, Felipe A. Montenegro, Nelson P. Barrera, y Juan P. Huidobro-Toro. «P2X4 Receptor in Silico and Electrophysiological Approaches Reveal Insights of Ivermectin and Zinc Allosteric Modulation». *Frontiers in Pharmacology* 8 (15 de diciembre de 2017): 918. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00918>.
- Ld, Botto, Moore Ca, Khoury Mj, y Erickson Jd. «Neural-Tube Defects». *The New England Journal of Medicine* 341, n.º 20 (11 de noviembre de 1999). <https://doi.org/10.1056/NEJM199911113412006>.
- Li, Wen-Chang, Monica Wagner, y Nicola J. Porter. «Behavioral Observation of Xenopus Tadpole Swimming for Neuroscience Labs». *Journal of Undergraduate Neuroscience Education: JUNE: A Publication of FUN, Faculty for Undergraduate Neuroscience* 12, n.º 2 (2014): A107-113.
- Liang, Xingqun, Mi-Ryoung Song, ZengGuang Xu, Guillermo M. Lanuza, Yali Liu, Tao Zhuang, Yihan Chen, Samuel L. Pfaff, Sylvia M. Evans, y Yunfu Sun. «Isl1 Is Required

- for Multiple Aspects of Motor Neuron Development». *Molecular and Cellular Neuroscience* 47, n.º 3 (julio de 2011): 215-22. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.04.007>.
- Liew, Hoe Peng, Semil P. Choksi, Kangli Noel Wong, y Sudipto Roy. «Specification of vertebrate slow-twitch muscle fiber fate by the transcriptional regulator Blimp1». *Developmental Biology* 324, n.º 2 (15 de diciembre de 2008): 226-35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.020>.
- Liou, H.-C, R.-S Yang, y W.-M Fu. «Potentiation of Spontaneous Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals by Glutamate in *Xenopus* Tadpoles». *Neuroscience* 75, n.º 1 (septiembre de 1996): 325-31. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00280-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00280-1).
- Lobikin, Maria, Jean-François Paré, David L. Kaplan, y Michael Levin. «Selective Depolarization of Transmembrane Potential Alters Muscle Patterning and Muscle Cell Localization in *Xenopus Laevis* Embryos». *The International Journal of Developmental Biology* 59, n.º 7-8-9 (19 de noviembre de 2015): 303-11. <https://doi.org/10.1387/ijdb.150198ml>.
- Lovrics, Anna, Yu Gao, Bianka Juhász, István Bock, Helen M. Byrne, András Dinnyés, y Krisztián A. Kovács. «Boolean Modelling Reveals New Regulatory Connections between Transcription Factors Orchestrating the Development of the Ventral Spinal Cord». Editado por Michael A. Fox. *PLoS ONE* 9, n.º 11 (14 de noviembre de 2014): e111430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111430>.
- Ludington, Sarah C., Jordan E. McKinney, Julie M. Butler, Maiah Gaines-Richardson, y Lauren A. O'Connell. «Activity of FoxP2-Positive Neurons Correlate with Tadpole Begging Behavior». Preprint. *Animal Behavior and Cognition*, 26 de mayo de 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.05.26.542531>.
- M, Bortolato, Yardley Mm, Khoja S, Godar Sc, Asatryan L, Finn Da, Alkana Rl, Louie Sg, y Davies Dl. «Pharmacological Insights into the Role of P2X4 Receptors in Behavioural Regulation: Lessons from Ivermectin». *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 16, n.º 5 (junio de 2013). <https://doi.org/10.1017/S1461145712000909>.
- Mandro, Michel, Joseph Nelson Siewe Fodjo, Alfred Dusabimana, Deby Mukendi, Steven Haesendonckx, Richard Lokonda, Swabra Nakato, et al. «Single versus Multiple Dose Ivermectin Regimen in Onchocerciasis-Infected Persons with Epilepsy Treated with Phenobarbital: A Randomized Clinical Trial in the Democratic Republic of Congo». *Pathogens* 9, n.º 3 (10 de marzo de 2020): 205. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030205>.
- Massé, Karine, y Nicholas Dale. «Purines as Potential Morphogens during Embryonic Development». *Purinergic Signalling* 8, n.º 3 (septiembre de 2012): 503-21. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9290-y>.

- Merck Sharp & Dohme (NZ) Ltd. 17 Mayo 2021. [STROMECTIONOL® ivermectin 3 mg tablets] data sheet. <https://www.medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/s/Stromectoltab.pdf> (9 Julio 2022).
- Milton, Philip, Jonathan I. D. Hamley, Martin Walker, y María-Gloria Basáñez. «Moxidectin: An Oral Treatment for Human Onchocerciasis». *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 18, n.º 11 (1 de noviembre de 2020): 1067-81. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1792772>.
- Miras-Portugal, M. Teresa, Priscilla Marin Garcia, L.M.G. Carrasquero, Esmerilda Delicado, Miguel Diaz-Hernandez, Juan Díaz-Hernández, M. Diez-Zaera, et al. «Physiological role of extracellular nucleotides at the central nervous system: Signalling through P2X and P2Y receptors». *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 73 (1 de enero de 2007): 1127-57.
- Morikawa, Y., T. Hisaoka, y E. Senba. «Characterization of Foxp2-Expressing Cells in the Developing Spinal Cord». *Neuroscience* 162, n.º 4 (septiembre de 2009): 1150-62. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.022>.
- Mughal, Bilal B., Michelle Leemans, Petra Spirhanzlova, Barbara Demeneix, y Jean-Baptiste Fini. «Reference Gene Identification and Validation for Quantitative Real-Time PCR Studies in Developing *Xenopus Laevis*». *Scientific Reports* 8, n.º 1 (11 de enero de 2018): 496. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18684-1>.
- N, Christodoulou, y Skourides Pa. «Cell-Autonomous Ca(2+) Flashes Elicit Pulsed Contractions of an Apical Actin Network to Drive Apical Constriction during Neural Tube Closure». *Cell Reports* 13, n.º 10 (15 de diciembre de 2015). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.017>.
- Nguyen, Nguyen Thanh, Trung Hai Nguyen, T. Ngoc Han Pham, Nguyen Truong Huy, Mai Van Bay, Minh Quan Pham, Pham Cam Nam, Van V. Vu, y Son Tung Ngo. «Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms Better Binding Affinity». *Journal of Chemical Information and Modeling* 60, n.º 1 (27 de enero de 2020): 204-11. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00778>.
- Nicolas, Patricia, Marta F Maia, Quique Bassat, Kevin C Kobylinski, Wuelton Monteiro, N Regina Rabinovich, Clara Menéndez, Azucena Bardají, y Carlos Chaccour. «Safety of Oral Ivermectin during Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis». *The Lancet Global Health* 8, n.º 1 (enero de 2020): e92-100. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30453-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30453-X).
- Nieuwkoop, Pieter Dirk, y Jacob Faber. *Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis*. Garland Pub., 1994.

- Nishimune, Hiroshi, y Kazuhiro Shigemoto. «Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease». *Neurologic Clinics* 36, n.º 2 (mayo de 2018): 231-40. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.01.009>.
- O’Rahilly, Ronan, y Fabiola Müller. «Neurulation in the Normal Human Embryo». En *Novartis Foundation Symposia*, editado por Gregory Bock y Joan Marsh, 1.ª ed., 70-89. Wiley, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470514559.ch5>.
- Oliveira, Ágatha, Peter Illes, y Henning Ulrich. «Purinergic Receptors in Embryonic and Adult Neurogenesis». *Neuropharmacology* 104 (mayo de 2016): 272-81. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.008>.
- Patten, I., y M. Placzek*. «The Role of Sonic Hedgehog in Neural Tube Patterning»: *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, n.º 12 (noviembre de 2000): 1695-1708. <https://doi.org/10.1007/PL00000652>.
- Pfaff, Samuel L., Monica Mendelsohn, Colin L. Stewart, Thomas Edlund, y Thomas M. Jessell. «Requirement for LIM Homeobox Gene Isl1 in Motor Neuron Generation Reveals a Motor Neuron– Dependent Step in Interneuron Differentiation». *Cell* 84, n.º 2 (enero de 1996): 309-20. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80985-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80985-X).
- Placzek, Marysia, Thomas M. Jessell, y Jane Dodd. «Induction of Floor Plate Differentiation by Contact-Dependent, Homeogenetic Signals». *Development* 117, n.º 1 (1 de enero de 1993): 205-18. <https://doi.org/10.1242/dev.117.1.205>.
- Qaisar, R., y L. Larsson. «What Determines Myonuclear Domain Size?» *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 58, n.º 1 (2014): 1-12.
- Release, S. (2024) 1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York. <https://www.schrodinger.com/maestro>
- Roberts, A. «How Does a Nervous System Produce Behaviour? A Case Study in Neurobiology». *Science Progress* 74, n.º 293 Pt 1 (1990): 31-51.
- Rost, Fabian, Christina Eugster, Christian Schröter, Andrew C. Oates, y Lutz Brusch. «Chevron formation of the zebrafish muscle segments». *The Journal of Experimental Biology* 217, n.º 21 (1 de noviembre de 2014): 3870-82. <https://doi.org/10.1242/jeb.102202>.
- Rotermund, Natalie, Kristina Schulz, Daniela Hirnet, y Christian Lohr. «Purinergic Signaling in the Vertebrate Olfactory System». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13 (16 de abril de 2019): 112. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00112>.
- Rouso, David L., Zachary B. Gaber, Deneen Wellik, Edward E. Morrisey, y Bennett G. Novitch. «Coordinated Actions of the Forkhead Protein Foxp1 and Hox Proteins in the Columnar Organization of Spinal Motor Neurons». *Neuron* 59, n.º 2 (julio de 2008): 226-40. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.025>.

- Roy, Sudipto, Christian Wolff, y Philip W. Ingham. «The U-Boot Mutation Identifies a Hedgehog-Regulated Myogenic Switch for Fiber-Type Diversification in the Zebrafish Embryo». *Genes & Development* 15, n.º 12 (15 de junio de 2001): 1563-76. <https://doi.org/10.1101/gad.195801>.
- Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). *PyMOL*. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>
- Sharma, Kamal, Hui Z Sheng, Karen Lettieri, Hung Li, Alexander Karavanov, Steven Potter, Heiner Westphal, y Samuel L Pfaff. «LIM Homeodomain Factors Lhx3 and Lhx4 Assign Subtype Identities for Motor Neurons». *Cell* 95, n.º 6 (diciembre de 1998): 817-28. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81704-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81704-3).
- Shen, Min-yi, y Andrej Sali. «Statistical Potential for Assessment and Prediction of Protein Structures». *Protein Science* 15, n.º 11 (noviembre de 2006): 2507-24. <https://doi.org/10.1110/ps.062416606>.
- Spencer, Kira A., Yesser Hadj Belgacem, Olesya Visina, Sangwoo Shim, Henry Genus, y Laura N. Borodinsky. «Growth at Cold Temperature Increases the Number of Motor Neurons to Optimize Locomotor Function». *Current Biology* 29, n.º 11 (junio de 2019): 1787-1799.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.072>.
- Sperlágh, Beáta, y Sylvester E. Vizi. «Neuronal Synthesis, Storage and Release of ATP». *Seminars in Neuroscience* 8, n.º 4 (agosto de 1996): 175-86. <https://doi.org/10.1006/smns.1996.0023>.
- Stojilkovic, Stanko S., Zonghe Yan, Tomas Obsil, y Hana Zemkova. «Structural Insights into the Function of P2X4: An ATP-Gated Cation Channel of Neuroendocrine Cells». *Cellular and Molecular Neurobiology* 30, n.º 8 (noviembre de 2010): 1251-58. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9568-y>.
- Stokes, Leanne, Janice A. Layhadi, Lucka Bibic, Kshitija Dhuna, y Samuel J. Fountain. «P2X4 Receptor Function in the Nervous System and Current Breakthroughs in Pharmacology». *Frontiers in Pharmacology* 8 (23 de mayo de 2017): 291. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00291>.
- Suurväli, Jaanus, Pierre Boudinot, Jean Kanellopoulos, y Sirje Rüütel Boudinot. «P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor». *Biomedical Journal* 40, n.º 5 (octubre de 2017): 245-56. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.010>.
- Suzuki, Makoto, Hitoshi Morita, y Naoto Ueno. «Molecular Mechanisms of Cell Shape Changes That Contribute to Vertebrate Neural Tube Closure». *Development, Growth & Differentiation* 54, n.º 3 (abril de 2012): 266-76. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01346.x>.
- Suzuki, Makoto, Masanao Sato, Hiroshi Koyama, Yusuke Hara, Kentaro Hayashi, Naoko Yasue, Hiromi Imamura, et al. «Distinct intracellular Ca²⁺ dynamics regulate apical

- constriction and differentially contribute to neural tube closure». *Development* 144, n.º 7 (1 de abril de 2017): 1307-16. <https://doi.org/10.1242/dev.141952>.
- Taylor, Mark J, Achim Hoerauf, y Moses Bockarie. «Lymphatic Filariasis and Onchocerciasis». *The Lancet* 376, n.º 9747 (octubre de 2010): 1175-85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60586-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60586-7).
- Thaler, Joshua P., Soo-Kyung Lee, Linda W. Jurata, Gordon N. Gill, y Samuel L. Pfaff. «LIM Factor Lhx3 Contributes to the Specification of Motor Neuron and Interneuron Identity through Cell-Type-Specific Protein-Protein Interactions». *Cell* 110, n.º 2 (julio de 2002): 37-49. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00823-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00823-1).
- Toch, Mathilde, Audrey Harris, Olivier Schakman, Elena Kondratskaya, Jean-Luc Boulland, Nicolas Dauguet, Stéphanie Debrulle, et al. «Onecut-Dependent Nkx6.2 Transcription Factor Expression Is Required for Proper Formation and Activity of Spinal Locomotor Circuits». *Scientific Reports* 10, n.º 1 (22 de enero de 2020): 996. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57945-4>.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Trott, Oleg, y Arthur J. Olson. «AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading». *Journal of Computational Chemistry* 31, n.º 2 (30 de enero de 2010): 455-61. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Vallstedt, Anna, Jonas Muhr, Alexandre Pattyn, Alessandra Pierani, Monica Mendelsohn, Maike Sander, Thomas M. Jessell, y Johan Ericson. «Different Levels of Repressor Activity Assign Redundant and Specific Roles to Nkx6 Genes in Motor Neuron and Interneuron Specification». *Neuron* 31, n.º 5 (septiembre de 2001): 743-55. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00412-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00412-3).
- Vangone, Anna, Joerg Schaarschmidt, Panagiotis Koukos, Cunliang Geng, Nevvia Citro, Mikael E Trellet, Li C Xue, y Alexandre M J J Bonvin. «Large-Scale Prediction of Binding Affinity in Protein–Small Ligand Complexes: The PRODIGY-LIG Web Server». Editado por Alfonso Valencia. *Bioinformatics* 35, n.º 9 (1 de mayo de 2019): 1585-87. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty816>.
- Wallace, A. C., R. A. Laskowski, y J. M. Thornton. «LIGPLOT: A Program to Generate Schematic Diagrams of Protein-Ligand Interactions». *Protein Engineering* 8, n.º 2 (febrero de 1995): 127-34. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>.
- Werler, Martha M., Katherine A. Ahrens, Jaclyn L.F. Bosco, Allen A. Mitchell, Marlene T. Anderka, Suzanne M. Gilboa, y Lewis B. Holmes. «Use of Antiepileptic Medications in

Pregnancy in Relation to Risks of Birth Defects». *Annals of Epidemiology* 21, n.º 11 (noviembre de 2011): 842-50. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2011.08.002>.

Witzemann, Veit. «Development of the Neuromuscular Junction». *Cell and Tissue Research* 326, n.º 2 (noviembre de 2006): 263-71. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0237-x>.

Xenopus: bioindicador modelo en pruebas de laboratorio». *UNIVERSITARIA* 1, n.º 3 (9 de enero de 2018): 20-21.

Yanes Calderón, Margeris, Marleni Mesa Suárez, y Damaris Marrero Escobedo. «Defecto del tubo neural». *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* 43, n.º 1 (marzo de 2017): 0-0.