



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Acciones de alcaloides de *Gelsemium* en
receptores inhibitorios y en la función sináptica.

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Ana María Marileo Córdova
CONCEPCIÓN-CHILE
2023

Profesor Guía: Gonzalo E. Yévenes Crisóstomo
Dpto. de Fisiología Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de
Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Gonzalo E. Yévenes Crisóstomo
Profesor Guía
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Jorge Fuentealba Arcos
Profesor Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Teresa Caprile
Profesor Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Patricio Iturriaga
Profesor Evaluador Externo
Universidad de la Frontera

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Aspectos generales de los receptores de GABA _A y de glicina.....	1
1.2. Los receptores de GABA _A : relevancia farmacológica y fisiológica.....	7
1.3. Los receptores de glicina: relevancia fisiológica y potencial como blanco farmacológico.....	16
1.4. Aspectos generales de las plantas del género <i>Gelsemium</i> y de sus alcaloides.....	22
1.4.1. Gelsemina.....	25
1.4.2. Gelsevirina.....	29
1.4.3. Koumina.....	30
1.4.4. Humantenmina.....	32
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	34
2.1. Hipótesis.....	34
2.2. Objetivo General.....	35
2.3. Objetivos específicos:.....	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. Reactivos.....	36
3.2. Cultivo celular y transfección de células HEK293.....	36
3.3. Registros electrofisiológicos en células HEK293.....	39
3.4. Cultivos neuronales.....	40
3.5. Cuantificación relativa de expresión de subunidades de GABA _A R.....	42
3.6. Registros electrofisiológicos de neuronas en cultivo.....	43
3.7. Microfluorimetría de Ca ²⁺ intracelular.....	44
3.8. Análisis estadístico.....	45

4. RESULTADOS.....	47
4.1. <i>Modulación de GABA_ARs recombinantes y nativos por gelsemina.</i>	47
4.2. <i>Modulación de GABA_ARs recombinantes por Gelsevirina, Koumina y Humantenmina.....</i>	58
4.3. <i>Modulación de GlyRs recombinantes por Gelsevirina, Koumina y Humantenmina.....</i>	61
4.4. <i>Sitios de unión putativos para los alcaloides de Gelsemium en GABA_ARs y en GlyRs.</i>	69
4.4.1. <i>Sitios de unión putativos para gelsemina en GABA_ARs.....</i>	71
4.4.2. <i>Sitios de unión putativos para alcaloides del Gelsemium en GlyRs. .</i>	74
4.5. <i>Acciones de los alcaloides de Gelsemium en la transmisión sináptica espontánea.....</i>	81
5. DISCUSION.....	94
5.1. <i>Modulación de GlyRs y GABA_ARs por alcaloides de la planta Gelsemium.....</i>	95
5.2. <i>Sitios moleculares y mecanismos asociados a la modulación de GlyRs y GABA_ARs por alcaloides del Gelsemium.</i>	99
5.3. <i>Acciones de los alcaloides del Gelsemium en la sinapsis.....</i>	107
5.4. <i>Implicancias de las acciones neurofisiológicas de los alcaloides del Gelsemium para sus efectos benéficos y tóxicos en modelos in vivo.</i>	110
6. CONCLUSIONES.....	116
7. ANEXOS.....	117
9. BIBLIOGRAFIA.....	125

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Plásmidos utilizados para el estudio de GABA_AR y GlyRs expresados en células HEK293.....	38
Tabla 2. Partidores utilizados para el estudio de expresión de ARNm de GABA_AR expresados en cultivo de neuronas corticales.....	42
Tabla 3. Propiedades farmacológicas de GABA_ARs recombinantes sensibles a BDZ expresados en células HEK293.	49
Tabla 4. Sensibilidad a gelsemina de GABA_ARs recombinantes sensibles a BDZ expresados en células HEK293.	53
Tabla 5. Sensibilidad a gelsemina de GABA_ARs nativos expresados en neuronas corticales de ratón en cultivo.....	58
Tabla 6. Sensibilidad a koumina, gelsevirina y humantenmina de GlyR recombinantes expresados en células HEK293.	68
Tabla 7. Propiedades farmacológicas de GABA_ARs recombinantes de configuración $\alpha 1(H101R)\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 1\beta 2$	73
Tabla 8. Efectos de la gelsemina sobre mIPSC GABAérgicas y mEPSC glutamatérgicas de neuronas corticales en cultivo	87

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Aspectos filogenéticos y estructurales de los pLGICs	3
Figura 2. Características generales de la neurotransmisión inhibitoria fásica y tónica.....	6
Figura 3. Sinapsis GABAérgica.....	9
Figura 4. Principales moduladores GABAérgicos.....	13
Figura 5. Sinapsis glicinérgica.....	17
Figura 6. Moduladores glicinérgicos con actividad analgésica.....	21
Figura 7. Alcaloides prominentes de las plantas de <i>Gelsemium</i>	24
Figura 8. Modulación de GlyRs por el alcaloide gelsemina.....	27
Figura 9. Sensibilidad a GABA de GABA _A Rs recombinantes sensibles a BDZ expresados en células HEK293.....	48
Figura 10. Ausencia de actividad agonista de gelsemina en GABA _A Rs recombinantes sensibles a BDZ expresados en células HEK293.....	50
Figura 11. Modulación de GABA _A Rs recombinantes sensibles a BDZ por gelsemina.....	52
Figura 12. Análisis de RT-qPCR de subunidades de GABA _A R sensibles a BDZ en neuronas corticales de ratón en cultivo.....	54
Figura 13. Modulación de GABA _A R nativos por gelsemina.....	55
Figura 14. Efectos de gelsemina en la afinidad aparente por GABA y en la cinética de las corrientes macroscópicas de cultivos de neuronas corticales.	57
Figura 15. Efectos de koumina, gelsevirina y humantenmina en GABA _A Rs de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	60
Figura 16. Acciones de koumina sobre GlyRs recombinantes expresados en células HEK293.....	63
Figura 17. Efectos de gelsevirina sobre GlyRs recombinantes expresados en células HEK293.....	65

Figura 18. El alcaloide humantenmina no modificó significativamente las corrientes activadas por glicina de GlyRs recombinantes.....	67
Figura 19. Relevancia del sitio de unión a las BDZ y de la subunidad $\gamma 2$ en las acciones de gelsemina en GABA _A Rs.	72
Figura 20. Acciones de gelsemina en GlyR quiméricos.	76
Figura 21. Efectos de alcaloides del <i>Gelsemium</i> en $\alpha 1$ GlyRs con mutaciones puntuales en residuos del sitio ortostérico.	80
Figura 22. Modulación de gelsemina de la neurotransmisión GABAérgica...	83
Figura 23. Modulación de la neurotransmisión glutamatérgica por gelsemina.	86
Figura 24. Efectos de gelsemina sobre la frecuencia de señales espontáneas de calcio intracelular.....	89
Figura 25. Modulación inducida por humantenmina de la neurotransmisión GABAérgica.	92
Figura 26. Resumen esquemático de la actividad de los principales alcaloides de la planta <i>Gelsemium</i> sobre GABA _A Rs y GlyRs.	99
Figura 27. Esquema de las acciones y mecanismos posibles de los alcaloides del <i>Gelsemium</i> en la sinapsis.	109
Figura 28. Modelo propuesto del mecanismo de acción asociado a alcaloides de la planta <i>Gelsemium</i>	112
Figura 29. Asociación de acciones biológicas de los alcaloides de la planta <i>Gelsemium</i> , con posibles mecanismos de acción.	115

FIGURAS DEL ANEXOS

Figura 1. Sitios moleculares de alcaloides del <i>Gelsemium</i> en GABA _A Rs	117
Figura 2. Sitios moleculares para gelsemina en GlyRs compuestos de la subunidad $\alpha 1$	119
Figura 3. Interacciones de los alcaloides del <i>Gelsemium</i> con los sitios ortostéricos de GlyRs compuestos de la subunidad $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$	120

Figura 4. Interacciones de residuos del sitio ortostérico de GlyRs con alcaloides del <i>Gelsemium</i>.....	122
Figura 5. Farmacóforo propuesto para las acciones de alcaloides del <i>Gelsemium</i> sobre GlyRs.....	123
Tabla 1. Efectos de la gelsemina sobre los receptores de glicina homoméricos y heteroméricos (GlyR) expresados en células HEK293.....	124

RESUMEN.

Los receptores ionotrópicos de GABA del tipo A (GABA_ARs) y de glicina (GlyRs) son fundamentales para la inhibición sináptica en el sistema nervioso central (SNC). En la sinapsis, los neurotransmisores GABA y glicina activan GlyRs y GABA_ARs postsinápticos, permitiendo el influjo de iones cloruro y la hiperpolarización del potencial de membrana, controlando así la excitabilidad neuronal. Alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica o glicinérgica se han asociado con trastornos prevalentes del SNC tales como epilepsia, depresión, ansiedad, dolor crónico, entre otros. La relevancia de la función GABAérgica ha sido resaltada por la buena eficacia de varios fármacos de uso clínico que poseen como blanco principal a los GABA_ARs. Por el contrario, actualmente no hay fármacos que tengan como blanco específico a los GlyRs.

Con relación a la farmacología de estos receptores, es importante mencionar que se han identificado diversos moduladores de GlyRs y GABA_ARs a partir de plantas y hongos. En este contexto, los alcaloides de las plantas de *Gelsemium* han demostrado efectos beneficiosos en diversas patologías del SNC. Sin embargo, estos compuestos han mostrado una alta toxicidad intrínseca, con un perfil toxicológico que sugiere posibles efectos a nivel neuronal. Los blancos moleculares de estos alcaloides en el SNC aún no están definidos. No obstante, existen estudios que han sugerido la posible participación de GlyRs y GABA_ARs en sus acciones. Este trabajo de tesis logró definir y caracterizar la actividad de los cuatro principales alcaloides del *Gelsemium* (gelsemina, gelsevirina, koumina y humantenmina) en GABA_ARs y GlyRs, y en la función sináptica de neuronas corticales. Utilizando

registros electrofisiológicos de GABA_ARs y GlyRs recombinantes, se demostró que gelsemina, koumina y gelsevirina inhibieron las corrientes glicinérgicas y GABAérgicas a concentraciones micromolares. El análisis de las concentraciones inhibitorias medias (IC₅₀) y del porcentaje de máxima inhibición mostró que los GlyRs poseen una sensibilidad mayor a estos alcaloides que los GABA_ARs. Contrariamente, humantenmina no modificó significativamente la actividad de GABA_ARs y GlyRs. Utilizando receptores quiméricos y mutados en combinación con técnicas bioinformáticas, se logró determinar que dos mutaciones puntuales en el sitio ortostérico fueron suficientes para generar GlyRs insensibles a gelsemina, koumina y gelsevirina, lo que sugiere que las acciones de estos alcaloides dependen únicamente de su unión al sitio ortostérico. Por otra parte, en el contexto de la sinapsis, se logró establecer que gelsemina disminuyó la frecuencia de los eventos sinápticos GABAérgicos y glutamatérgicos en miniatura de neuronas corticales, sin modificar significativamente la amplitud. De modo interesante, se obtuvieron resultados similares utilizando el alcaloide humantenmina, demostrando que la inhibición directa de GlyRs o GABA_ARs no es necesaria para los efectos sinápticos. Finalmente, estudios de fluorimetría de Ca²⁺ intracelular lograron demostrar que gelsemina disminuyó la frecuencia de las señales espontáneas de Ca²⁺, sugiriendo que gelsemina, y posiblemente otros alcaloides del *Gelsemium*, modulan la sinapsis a través de la interacción con blancos moleculares presinápticos.

En conjunto, los resultados de esta tesis proporcionan información novedosa sobre las acciones funcionales y los sitios moleculares de los principales alcaloides

del *Gelsemium* en GABA_ARs y GlyRs. El perfil de actividad de gelsemina, koumina y gelsevirina en estos canales iónicos sugiere que estas interacciones pudieran estar asociadas a su toxicidad. Por el contrario, los resultados encontrados para humantemina y gelsemina a nivel neuronal sugieren que su actividad biológica estaría relacionada con blancos moleculares presinápticos, diferentes a GABA_ARs y GlyRs. Estas acciones sinápticas proporcionan una hipótesis novedosa para explicar los diversos efectos beneficiosos de los alcaloides del *Gelsemium*. En resumen, los resultados de este trabajo contribuyen a dilucidar, al menos en parte, los mecanismos involucrados en las acciones beneficiosas y tóxicas de los alcaloides del *Gelsemium* a nivel del SNC de mamíferos.

ABSTRACT.

Ionotropic gamma-aminobutyric acid type A receptors (GABA_ARs) and glycine receptors (GlyRs) play a fundamental role in synaptic inhibition within the central nervous system (CNS). At synapses, neurotransmitters GABA and glycine activate postsynaptic GlyRs and GABA_ARs, facilitating the entry of chloride ions and inducing membrane hyperpolarization to regulate neuronal excitability. Dysregulation of GABAergic or glycinergic neurotransmission has been associated with prevalent CNS disorders such as epilepsy, depression, anxiety, and chronic pain. The significance of GABAergic function is underscored by the efficacy of various clinically used drugs targeting GABA_ARs. In contrast, there are currently no drugs specifically targeting GlyRs.

Regarding the pharmacology of these receptors, various modulators of GlyRs and GABA_ARs have been identified from plants and fungi. In this context, alkaloids from *Gelsemium* plants have demonstrated beneficial effects in various CNS pathologies. However, these compounds exhibit high intrinsic toxicity, with a toxicological profile suggesting potential neuronal effects. The molecular targets of these alkaloids in the CNS are yet to be defined. Nevertheless, studies have suggested the possible involvement of GlyRs and GABA_ARs in their actions.

This thesis successfully defined and characterized the activity of the four main *Gelsemium* alkaloids (gelsemine, gelsevirine, koumine, and humantenmine) on GABA_ARs, GlyRs, and synaptic function in cortical neurons. Using electrophysiological recordings from recombinant GABA_ARs and GlyRs, it was demonstrated that Gelsemine, Koumine, and Gelsevirine inhibited glycinergic and

GABAergic currents at micromolar concentrations. Analysis of the half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) and the percentage of maximum inhibition revealed that GlyRs exhibit greater sensitivity to these alkaloids than GABA_ARs. Conversely, Humantenmine did not significantly alter the activity of GABA_ARs and GlyRs. Using chimeric and mutated receptors in combination with bioinformatics, it was determined that two-point mutations in the orthosteric site were sufficient to generate GlyRs insensitive to Gelsemine, Koumine, and Gelsevirine, suggesting that the functional effects of these alkaloids depend solely on their binding to the orthosteric site.

Moreover, in the synaptic context, Gelsemine was found to decrease the frequency of GABAergic and glutamatergic miniature synaptic events in cortical neurons without significantly affecting amplitude. Interestingly, similar results were obtained with the alkaloid humantenmine, demonstrating that direct inhibition of GlyRs or GABA_ARs is not necessary for these synaptic effects. Finally, intracellular Ca^{2+} fluorimetry studies demonstrated that gelsemine significantly reduced the frequency of spontaneous Ca^{2+} signals, suggesting that Gelsemine, and possibly other *Gelsemium* alkaloids, modulate synapses through interaction with presynaptic molecular targets.

Collectively, the results of this thesis provide novel insights into the functional actions and molecular sites of *Gelsemium*'s main alkaloids on GABA_ARs and GlyRs. The activity profile of gelsemine, koumine, and gelsevirine on these ion channels suggests a potential association with their toxicity. Conversely, the findings for humantenmine and gelsemine at the neuronal level suggest that their biological

activity may be related to presynaptic molecular targets, different from GABA_ARs and GlyRs. These synaptic actions provide a novel hypothesis to explain the diverse beneficial effects of *Gelsemium* alkaloids. In summary, the results of this work contribute to elucidating, at least in part, the mechanisms involved in the beneficial and toxic actions of *Gelsemium* alkaloids in the mammalian CNS.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Aspectos generales de los receptores de GABA_A y de glicina.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) y glicina (Gly) son los principales neurotransmisores inhibitorios del sistema nervioso central (SNC). Estas moléculas son sintetizadas en la sección terminal del axón de las neuronas inhibitorias y almacenados en vesículas mediante el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT, del inglés *The Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter*) (Shimizu-Okabe et al., 2022; Zeilhofer, Benke, et al., 2012). Estos neurotransmisores interaccionan con receptores ampliamente expresados en neuronas de todo el SNC, los que han sido clasificados principalmente en base a sus estructuras y sus perfiles farmacológicos. Por una parte, encontramos los receptores de tipo ionotrópico, los cuales son canales iónicos clásicamente conocidos como receptores de glicina (GlyRs) y receptores de GABA_A (GABA_ARs) (Hammond, 2015; Kandel, 2000) y, por otra parte, se encuentran los receptores metabotrópicos, los cuales son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), donde encontramos a los receptores de GABA_B (Sallard et al., 2021), y al recientemente descubierto receptor metabotrópico activado por glicina, denominado GPR158 o mGlyR (Laboute et al., 2023).

En este estudio nos enfocaremos en los receptores ionotrópicos GlyRs y GABA_ARs, los cuales son proteínas transmembránicas que conforman un poro permeable a Cl⁻ (Hammond, 2015; Kandel, 2000). Ambos grupos de receptores

pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando pentaméricos (pLGICs, del inglés *pentameric ligand-gated ion channels*), dentro de la cual también se encuentran los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), los receptores de serotonina tipo 3 (5-HT₃R), y otros canales que son expresados en bacterias (Figura 1) (Corringer et al., 2012; Dutertre et al., 2012; Lara et al., 2020; Nys et al., 2013); Z. S. Wu et al. (2015). Datos estructurales de esta familia de receptores han revelado una arquitectura conservada en forma de cilindro para todos los pLGICs, en las que cinco subunidades están dispuestas alrededor de un eje central (Corringer et al., 2012; Lara et al., 2020; Nys et al., 2013). Cada subunidad de los pLGICs posee una estructura conservada que está compuesta por un dominio extracelular (ECD, del inglés *extracellular domain*), en el cual se ubican los sitio ortostéricos, 4 dominios transmembrana (TM1-4) los cuales conforman el poro del canal, y un dominio intracelular (ICD del inglés *intracellular domain*) entre los dominios TM3 y TM4 (Z. S. Wu et al., 2015).

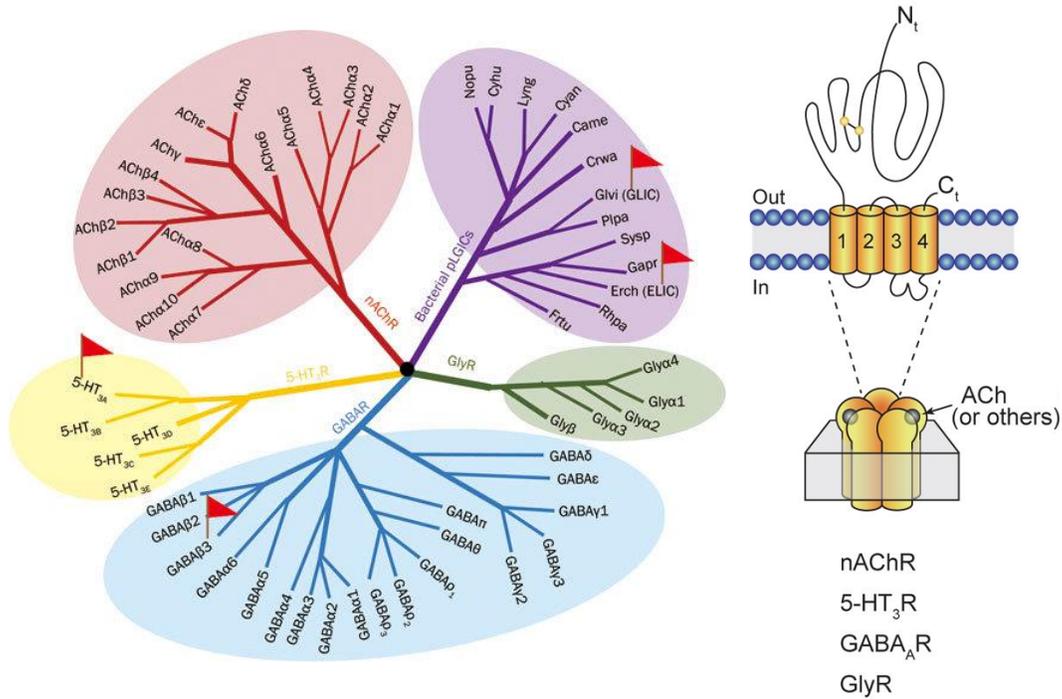


Figura 1. Aspectos filogenéticos y estructurales de los pLGICs. A. Árbol filogenético de los principales pLGICs identificados en bacterias y en mamíferos. B. Estructura esencial de una subunidad de pLGIC y su conformación pentamérica funcional. Adaptado de Lemoine et al., 2012.(Lemoine et al., 2012)

Los sistemas de neurotransmisión asociados a los pLGICs son claves para el funcionamiento, regulación, mantención y desarrollo del SNC. La importancia de los GlyRs y GABA_ARs ha sido ampliamente descrita con relación al control de la excitabilidad neuronal a través de la inhibición sináptica gatillada por la entrada de cloruro a neuronas del SNC (Hammond, 2015; Kandel, 2000). La regulación inhibitoria controla eventos fisiológicos vitales, tales como regulación sensorial somática, movimiento, locomoción, tono muscular y ritmo respiratorio (Chua &

Chebib, 2017; Hammond, 2015; Kandel, 2000; Lynch, 2009; Mohler, 2009). Consistente con su relevancia fisiológica, alteraciones a la neurotransmisión GABAérgica o glicinérgica han sido relacionadas con desórdenes del SNC, tales como epilepsia (Lasoń et al., 2013; Mastrangelo, 2021; Wu et al., 2023), depresión (Luscher et al., 2011), trastornos de ansiedad (El Matine et al., 2023; McCool et al., 2003; Möhler, 2012), trastornos del espectro autista (Kang & Barnes, 2013), hiperekplexia (Absalom et al., 2020; Becker et al., 2002; Harvey, 2019; Schaefer et al., 2013; Tijssen et al., 1997; Vuilleumier et al., 2018; Zou et al., 2019), esquizofrenia (de Bartolomeis et al., 2020; Harvey & Yee, 2013; Iqbal et al., 2023; Möhler et al., 2008; Yang & Tsai, 2017) y dolor crónico (Lara et al., 2020; Yeo et al., 2022; Zeilhofer et al., 2018; Zeilhofer, Benke, et al., 2012; Zeilhofer et al., 2021), entre otros (Jacob, 2019; Jahangir et al., 2021; Planells-Cases & Jentsch, 2009; Sakimoto et al., 2021; Sun et al., 2019; Wu et al., 2020; Xing et al., 2021).

Los ligandos canónicos de estos receptores, los neurotransmisores GABA y glicina, son liberados desde los botones presinápticos mediante la fusión de las vesículas presinápticas con la membrana plasmática. Los neurotransmisores difunden por el espacio sináptico, y se unen con los receptores de manera limitada en el tiempo. La unión de los agonistas con sus receptores desencadena una serie de cambios conformacionales en el complejo pentamérico del receptor, el cual se transmite desde los ECD hasta los TM2 que conforman la pared interna del poro central, abriendo transitoriamente el poro del canal y permitiendo el flujo de iones Cl^- (Nemecz et al., 2016). En el sistema nervioso adulto, y en parte debido al potencial de equilibrio del Cl^- , la apertura de los GlyRs y GABA_ARs genera

principalmente un influjo de Cl^- y, en consecuencia, una hiperpolarización del potencial de membrana, logrando un control rápido de la excitabilidad neuronal (Doyon et al., 2016). Los GlyRs y GABA_ARs que están localizados en el sitio activo de la sinapsis se encuentran agrupados mediante proteínas de andamiaje intracelulares como gefirina, permitiendo la formación de agrupaciones sinápticas de receptores (“*clusters*”), los que aumentan la eficiencia de la transmisión sináptica (Groeneweg et al., 2018). La activación de los GlyRs y GABA_ARs sinápticos generan una inhibición fásica de las neuronas, caracterizada por activaciones rápidas y transitorias de los receptores, las cuales son definidas experimentalmente como corrientes postsinápticas inhibitorias GABAérgicas o glicinérgicas (“GABAergic-IPSCs o Gly-IPSCs”). Estas corrientes se caracterizan por mostrar amplitudes variables, tiempos de activación muy cortos (<0.5 ms) y tiempos de decaimiento variables, en general, menores a 30-40 ms en total (Sallard et al., 2021). En contraste, existen poblaciones de GlyRs y GABA_ARs que se expresan en el espacio extrasináptico de las neuronas, los cuales pueden estar activados de manera sostenida por bajas concentraciones de agonista. A este tipo de activación se le denomina inhibición tónica, la cual es caracterizada por corrientes constantes de amplitudes menores (< 20pA) y duración temporal permanente (Farrant & Nusser, 2005). Diversos estudios han demostrado que la inhibición fásica y tónica contribuyen, en conjunto, al control de la excitabilidad neuronal en todo el SNC (Farrant & Nusser, 2005). Finalmente, la disponibilidad de estos neurotransmisores en el espacio sináptico está controlada por sistemas de transportadores específicos:

la familia de transportadores de GABA (GAT1, GAT2 y GAT3) y de glicina (GlyT1 y GlyT2) (Farrant & Nusser, 2005; Zeilhofer, Benke, et al., 2012).

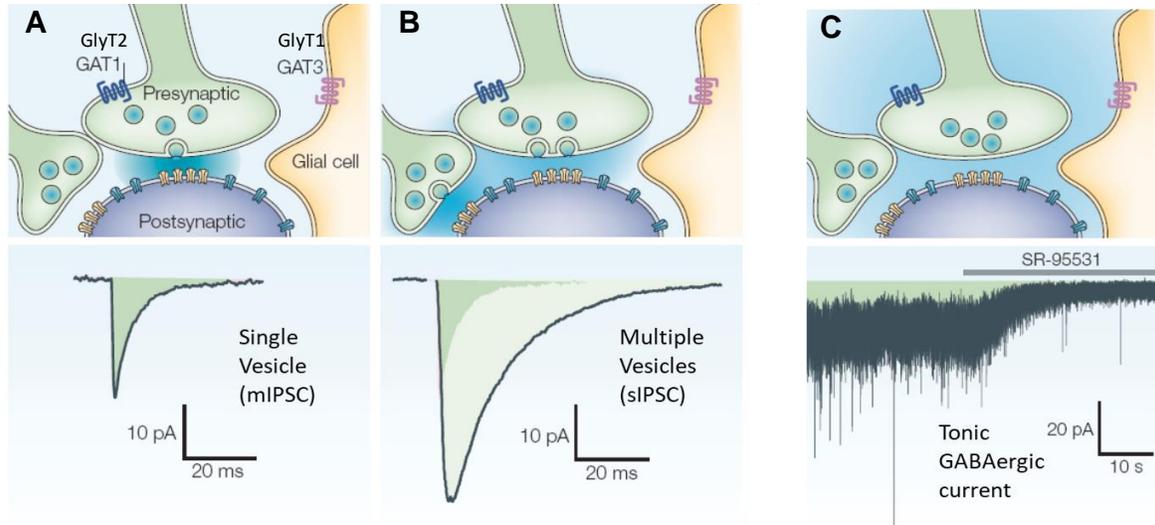


Figura 2. Características generales de la neurotransmisión inhibitoria fásica y tónica. A-B. Neurotransmisión inhibitoria fásica. **A.** La liberación de una única vesícula sináptica resulta en una corriente postsináptica denominada “corriente inhibitoria postsináptica en miniatura” o mIPSC. **B.** La liberación de múltiples vesículas sinápticas resulta en una corriente postsináptica, generalmente de mayores amplitudes, denominada “corriente inhibitoria postsináptica espontanea” o sIPSC. **C.** Neurotransmisión inhibitoria tónica. En ausencia de liberación vesicular de neurotransmisores, los GlyRs y/o GABA_ARs localizados fuera del sitio activo sináptico pueden ser activados constantemente por concentraciones menores de neurotransmisor, generando una corriente de amplitud limitada pero estable en el tiempo. Ambos tipos de neurotransmisión han sido caracterizados para GlyRs y GABA_ARs. Adaptado de Farrant & Nusser, 2005.

1.2. Los receptores de GABA_A: relevancia farmacológica y fisiológica.

Para los GABA_ARs se han descubierto 16 genes (GABRA1 – GABRA6, GABRB1 – GABRB3, GABRG1 – GABRG3, GABRD, GABRE, GABRP, GABRQ) que codifican para 16 subunidades diferentes (α 1- 6, β 1- 3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π), excluyendo a los genes codificantes (GABRR1 – GABRR3) para las tres subunidades ρ (ρ 1-3) (Ghit et al., 2021). Estas subunidades, al ensamblarse entre sí, son capaces de conformar canales iónicos con características similares al resto de GABA_ARs, pero debido a su diverso perfil farmacológico, en varios estudios se clasifican como grupos de receptores independientes (receptor de GABA_C, GABA_CRs). Sin embargo, el *Nomenclature Committee of IUPHAR* ha determinado que los receptores compuestos por la subunidad ρ deben ser clasificados como parte de los GABA_ARs y recomiendan limitar el uso de GABA_CRs para títulos, resúmenes o en las menciones de este receptor en publicaciones iniciales (Olsen & Sieghart, 2009).

A pesar de la amplia diversidad de subunidades, las cuales podrían dar origen a variadas posibilidades de ensamblajes, se ha descrito que solo un limitado de configuraciones es expresado en neuronas. Se estima que podrían haber alrededor de 500 subtipos diferentes del GABA_ARs expresados en mamíferos (Sallard et al., 2021). Lo concreto es que, a la fecha, se ha determinado que el \approx 60% de los GABA_ARs corresponden a la conformación α 1 β 2 γ 2. Los otros subtipos mayormente encontrados son α 2 β 3 γ 2 y α 3 β 3 γ 2 (<20-25%), mientras que α 4–6 β γ 2, α 6 β 2–3 δ , α 4 β 2–3 δ , α β y ρ 1–3 son menos abundantes (<5%). Los subtipos menores cuya

existencia fisiológica *in vivo* se considera probable incluyen a $\alpha 1\beta\delta$, $\alpha 2\beta 1\gamma 1$, $\alpha\beta\epsilon$, $\alpha\beta\pi$, $\alpha\beta\theta$, $\alpha 1\alpha 6\beta\gamma 2$, $\alpha 1\alpha 6\beta\delta$ and $\alpha\beta\gamma 3$ (Olsen & Sieghart, 2009; Sallard et al., 2021).

La estequiometría más aceptada de los GABA_ARs es 2 α :2 β :1 γ en una disposición β - α - β - α - γ , dispuesta en sentido anti-horario en torno al poro central. Dentro de esta se encuentra mayormente conservada la porción β - α - β - α , mientras que la posición de γ es modular, pudiendo ser reemplazada por cualquiera de los otros subtipos de subunidades, incluyendo otra subunidad α o β (Botzolakis et al., 2016). Además, se ha descrito que solo $\beta 3$ y $\rho 1$ son capaces de generar homopentámeros funcionales en sistemas heterólogos (Hannan & Smart, 2018).

Por otra parte, se ha determinado que estas subunidades poseen diferentes perfiles de distribución espacial y temporal. Por ejemplo, algunas subunidades, como $\alpha 1-3$, β y $\gamma 2$, muestran una distribución ubicua, mientras que otras, como $\alpha 6$ y ρ , tienen una distribución muy restringida (Ghit et al., 2021). La distribución anatómica de cada subunidad está estrechamente ligada a su función, tanto a nivel celular como sistémica. A nivel celular, se ha determinado que la migración de GABA_ARs al espacio post-sináptico requiere la presencia de la subunidad γ , mediando la inhibición fásica. Su reemplazo con la subunidad δ genera una localización extrasináptica, lo que contribuye mayormente a la inhibición tónica (Hannan et al., 2020; Nusser et al., 1998; Sun et al., 2022; Wei et al., 2003; Zhang et al., 2007). A partir de esta información se ha logrado esquematizar la estructura básica de la sinapsis GABAérgica, la cual está compuesta por neuronas presinápticas que sintetizan GABA a partir de glutamato, el cual es posteriormente almacenado en vesículas por VIAAT y liberado al espacio sinápticos. Además,

circundantes al espacio sináptico, se encuentran los transportadores de GABA, GAT-1 y GAT-3 (del inglés *GABA transporter 1 y 3*) expresados en la neurona presináptica y en los astrocitos respectivamente (Jin et al., 2011). Estos transportadores se encargan de la recaptación de GABA. Finalmente, en la membrana posináptica, se encuentran mayormente expresados GABA_ARs que contienen las subunidades $\alpha 1/2/3\beta 2/3\gamma 2$ unidas a gefirina como la proteína de anclaje fundamental (Govindpani et al., 2017; Shimizu-Okabe et al., 2022).

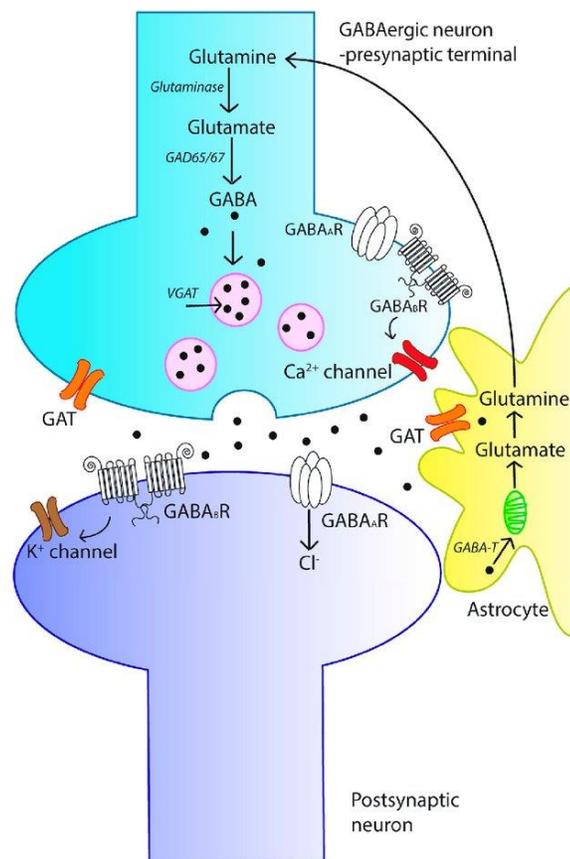


Figura 3. Sinapsis GABAérgica. El esquema resume los componentes principales de la sinapsis GABAérgica, en las cuales los GABA_ARs y los GABA_BRs coordinan diferentes tipos de respuestas celulares al neurotransmisor GABA. Extraído desde (Govindpani et al., 2017).

La caracterización farmacológica de los GABA_ARs ha desempeñado un papel fundamental en la comprensión de sus funciones fisiológicas y fisiopatológicas. En combinación con herramientas de mutagénesis y proteómica, estas investigaciones han permitido el esclarecimiento de su distribución y composición en el SNC. Dentro de esta amplia variedad de ligandos, destacan las benzodiazepinas (BDZ), los neuroesteroides, y algunos anestésicos generales de uso clínico, como el propofol (Cerne et al., 2022; Ghit et al., 2021; Knoflach & Bertrand, 2021). Las BDZ, son un grupo de moléculas con gran relevancia clínica y biomédica, ya que se encuentra en el listado de fármacos más consumidos a nivel mundial, principalmente por su actividad ansiolítica, hipnótica y anticonvulsiva. Se caracterizan por ser selectivas a GABA_ARs compuestos por la subunidad $\gamma 2$ y de al menos una subunidad $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ (Cerne et al., 2022; Ghit et al., 2021; Knoflach & Bertrand, 2021; Wieland et al., 1992). En contraste, los GABA_ARs compuestos por las subunidades $\alpha 4/6$ y δ son insensibles a BDZ (Möhler et al., 2002). Posteriormente, se determinó que la diferencia entre las subunidades α sensibles e insensibles a BDZ estaba determinada por la presencia de un residuo de histidina en la región extracelular de la subunidad $\alpha 1$ en la posición 101 (H101) (Crestani et al., 2000; Rudolph et al., 1999). Este residuo se encuentra conservado en las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, y $\alpha 5$, mientras que $\alpha 4$ y $\alpha 6$ expresan un residuo de arginina (Löw et al., 2000; Möhler et al., 2002). Estudios subsecuentes que utilizaron receptores con mutaciones puntuales en este residuo confirmaron su importancia funcional, ya que la mutación H101R en la subunidad $\alpha 1$ generó GABA_ARs insensibles a las BDZ. Esto impulsó la generación de sistemas *in vivo* que permitieron correlacionar las diferentes

subunidades del GABA_ARs con efectos neurofisiológicos de las BDZ en estudios de comportamiento animal. En el año 1999 y 2000 se crearon dos modelos de ratón que incorporaron las mutaciones $\alpha 1(H101R)$ (Rudolph et al., 1999) y $\alpha 2(H101R)$ (Löw et al., 2000). A través de estudios de comportamiento, se evaluaron los efectos del diazepam, una BDZ clásica, sobre la actividad motora, coordinación y niveles de ansiedad de estos ratones, logrando asociar estos efectos *in vivo* a diferentes subunidades del receptor. Por ejemplo, se observó que altas dosis de diazepam (30 mg/kg) no afectó la actividad motora de los ratones *knock-in* $\alpha 1H101R$, por lo que se asoció los efectos sedativos del diazepam a GABA_ARs compuestos de la subunidad $\alpha 1$. De modo interesante, se encontró una disminución en los niveles de ansiedad similar a los ratones *wild-type* (Rudolph et al., 1999). En estudios subsecuentes con ratones *knock-in* $\alpha 2H101R$, se observó disminución de la actividad motora y la coordinación luego de la administración de diazepam, pero no se observaron efectos ansiolíticos (Löw et al., 2000). Estos hallazgos permitieron concluir que los efectos sedativos del diazepam, y de la mayoría de las BDZ, son mediados principalmente por la modulación de GABA_ARs compuestos de la subunidad $\alpha 1$, mientras que los efectos ansiolíticos están mediados por GABA_ARs compuestos de la subunidad $\alpha 2$ (Löw et al., 2000; Rudolph et al., 1999). Estos resultados han sido confirmados y expandidos en múltiples estudios subsecuentes (Ghit et al., 2021; Knoflach & Bertrand, 2021; Ralvenius et al., 2015).

Además de las BDZ, ha sido relevante la determinación de la función fisiológica de las subunidades de GABA_ARs que configuran su sensibilidad a los neuroesteroides, los cuales son moléculas endógenas que presentan efectos

ansiolíticos, hipnóticos, anestésicos, y anticonvulsivos (Belelli et al., 2022; Covey et al., 2023). Además, se han relacionado en mecanismos de memoria, neuroprotección y en acciones conductuales (Mellon, 2007; Reddy, 2010). El neuroesteroide más estudiado en este contexto es la allopregnanolona (Cerne et al., 2022; Cornett et al., 2021; Lüscher & Möhler, 2019). Inicialmente se había descrito su sitio de unión en la interfaz de los TM las subunidades α y β (Alvarez et al., 2019; Hosie et al., 2006). El dominio M1 de la subunidad α , específicamente una glutamina altamente conservada en la posición 241, desempeña un papel clave en la modulación de los neuroesteroides (Hosie et al., 2006). Estudios electrofisiológicos lograron demostrar de manera consistente que los GABA_ARs que contienen la subunidad δ presentan una mayor sensibilidad a neuroesteroides (Lüscher & Möhler, 2019; Stell et al., 2003). En línea con esta información, el ratón *knock-out* a la subunidad δ se ha caracterizado por tener una mayor resistencia a los efectos sedativos y ansiolíticos de los neuroesteroides (Mihalek et al., 1999; Spigelman et al., 2002). La subunidad δ se ha encontrado expresada en la corteza prefrontal (Centanni et al., 2017), amígdala (Marowsky & Vogt, 2014), bulbo raquídeo (Montandon et al., 2017), cerebelo, tálamo e hipocampo (Sun et al., 2018), principalmente asociada a las subunidades $\alpha 4/6$ y $\beta 1/3$ (Dalby et al., 2020; Ghit et al., 2021; Glykys et al., 2008; Sperk et al., 1997). Finalmente, es relevante mencionar que el conocimiento acerca de la modulación de los neuroesteroides de GABA_ARs compuestos de la subunidad δ y de su relevancia fisiológica en el contexto del embarazo ha contribuido a generar el primer tratamiento farmacológico contra la depresión post-parto (Cornett et al., 2021; Lüscher & Möhler, 2019).

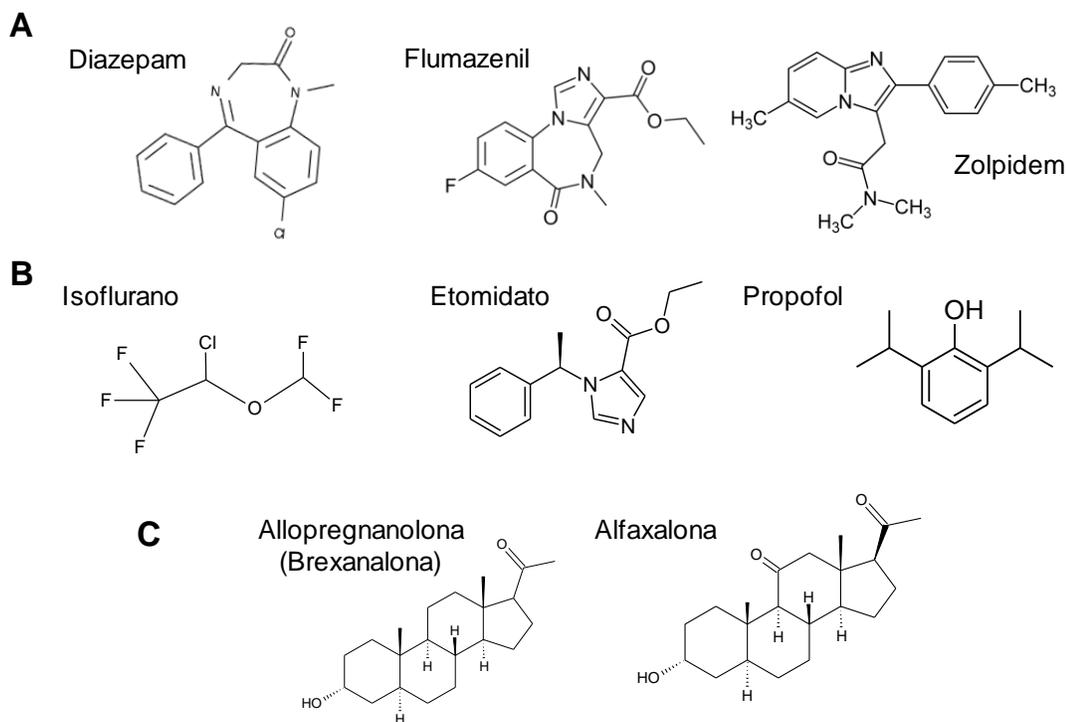


Figura 4. Principales moduladores GABAérgicos. A. Ligandos del sitio de las BDZ. Diazepam es un BDZ clásica que potencia la actividad de GABA_ARs, mientras que Flumazenil es un antagonista del sitio de las BDZ. Zolpidem es un modulador correspondiente al grupo de las drogas no-BDZ (“Z-drugs”) que posee una selectividad parcial por GABA_ARs compuestos de la subunidad $\alpha 1$. **B.** Anestésicos generales. Isoflurano es un anestésico general volátil, mientras que etomidato y propofol son anestésicos generales endovenosos. **C.** Esteroides neuroactivos. Allopregnanolona es un neuroesteroide endógeno, mientras que Alfaxalona es un esteroide neuroactivo de origen sintético. La versión sintética de Allopregnanolona es comercializada con el nombre de Brexanalona (Zulresso, SAGE Therapeutics) y es utilizada como tratamiento contra la depresión post-parto desde su aprobación por la FDA el 2018 (Cerne et al., 2022; Cornett et al., 2021; Lüscher & Möhler, 2019).

La disección molecular de los roles fisiológicos de diferentes subunidades de GABA_ARs se ha delineado mayormente a través del estudio de animales genéticamente modificados. Por una parte, se encontró que el animal *knock-out* para $\alpha 1$ fue viable y presentaba un fenotipo muy similar a animales *wild-type*, sin defectos neurológicos o motores evidentes (Sur et al., 2001). Sin embargo, los animales *knock-out* para $\gamma 2$ mueren a los pocos días de nacer (Günther et al., 1995). Por otra parte, otros ensayos mostraron que el retraso en el desarrollo de *knock-out* de $\gamma 2$, utilizando la estrategia Cre-loxP, resultó en ratones fenotípicamente normales 3 semanas después del parto, para luego exhibir un rápido deterioro, incluyendo episodios epilépticos y la muerte (Schweizer et al., 2003). Además, resultó en la pérdida de los sitios de unión de las BDZ y la pérdida de la asociación de los receptores sinápticos de GABA_ARs con la proteína de andamiaje gefirina. Estas evidencias contribuyeron a determinar que la subunidad $\gamma 2$ contribuye a la localización postsináptica de estos receptores a través de gefirina (Schweizer et al., 2003). Finalmente, ratones con expresión atenuada de $\gamma 2$ en todo el cerebro dio origen a un deterioro de la conducta, incluido un fenotipo ansioso-depresivo aumentado (Chandra et al., 2005; Crestani et al., 1999; Earnheart et al., 2007), mientras que ratones $\gamma 2$ heterocigotos mostraron una maduración defectuosa de la columna vertebral (Ren et al., 2015).

Otros estudios han determinado la relevancia de diferentes subunidades β de los GABA_ARs. Por ejemplo, animales *knock-out* para la subunidad $\beta 3$ presentaron fenotipos de epilepsia, además de déficit de aprendizaje y deficiencias motoras con hiperactividad. De modo interesante, se ha descrito que en torno al

90% de las crías de estos animales mueren como neonatos y muchos presentan desarrollo anormal del paladar (DeLorey et al., 1998; Ferguson et al., 2007). Estas características hicieron posible que algunos investigadores hayan propuesto este animal como un modelo para el estudio del síndrome de Angelman (DeLorey et al., 1998). De modo complementario, otros estudios realizados sobre ratones *knock-out* para la subunidad $\beta 2$ presentaron alteraciones conductuales de ansiedad y depresión, además de cambios importantes en las habilidades sociales, de aprendizaje y memoria (Gao et al., 2022). Estos hallazgos se han correlacionado con alteraciones psiquiátricas como trastorno bipolar (Chen et al., 2009; Perlis et al., 2008), trastorno depresivo mayor (Zhao et al., 2009), y trastorno disfórico premenstrual (Gao et al., 2022; Ullah et al., 2020), entre otras.

Sobre la subunidad $\alpha 5$ se ha descrito que solo representa menos del 5% de toda la población de GABA_ARs. Debido a que su expresión es predominantemente en la corteza cerebral, e hipocampo (Caraiscos et al., 2004), sus funciones se han asociado a regulación de procesos de aprendizaje y memoria (Rudolph & Mohler, 2004). De modo interesante, ratones *knock-out* para esta subunidad presentaron una mejoría en el aprendizaje espacial, y una subsecuente disminución de la amplitud de las corrientes sinápticas (Collinson et al., 2002). Por lo cual, actualmente, se considera como un posible blanco farmacológico para combatir el deterioro cognitivo asociado a síndrome de Down y esquizofrenia, y los déficits conductuales asociados a trastornos del espectro autista (Kasaragod et al., 2023).

1.3. Los receptores de glicina: relevancia fisiológica y potencial como blanco farmacológico.

A la fecha se han descrito cuatro genes (denominados *Glr1-4*) que codifican para las subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) y un único gen (*Glrb*) que codifica para la subunidad β (Dutertre (Dutertre et al., 2012). Sin embargo, el gen del $\alpha 4$ GlyR es un pseudogen en humanos y existe poca evidencia de su expresión funcional en ratas (Lynch, 2009). Existe una identidad de aminoácidos mayor al 80% entre subunidades α , mientras que entre subunidades α y β existe una identidad de alrededor de 50% (Dutertre et al., 2012). A pesar de la alta identidad entre las subunidades α , éstas presentan una expresión espacio-temporal diferente, así como también muestran propiedades cinéticas distintas y, en algunos casos, también hay divergencias en su sensibilidad a agonistas y moduladores alostéricos (Acuña et al., 2016; Beato et al., 2004; Krashia et al., 2011; Lara et al., 2016; Lynch, 2009; Marabelli et al., 2013; Yevenes et al., 2010; Zeilhofer et al., 2018).

En general, los GlyRs funcionales existen como homopentámeros conformados por cinco subunidades α , o como heteropentámeros, con una estequiometría recientemente descrita de cuatro subunidades α y una β (Yu et al., 2021; Zhu & Gouaux, 2021). Los GlyRs son estabilizados en la densidad postsináptica debido a la interacción del ICD de la subunidad β con la proteína de andamiaje gefirina (Alvarez, 2017; Groeneweg et al., 2018; Tyagarajan & Fritschy, 2014). De este modo, es ampliamente aceptado que los GlyRs sinápticos comprenden mayoritariamente complejos heteroméricos (Lynch, 2009; Maynard et al., 2021). La recaptación de la glicina liberada al espacio sináptico es mediada por

dos transportadores de glicina, ubicados en la membrana de astrocitos (GlyT1) o en neuronas presinápticas (GlyT2), esto sumado al VIAAT previamente mencionado, comprenden los elementos básicos que podemos encontrar en neuronas inhibitorias glicinérgicas(Cioffi, 2018; Zeilhofer, Benke, et al., 2012).

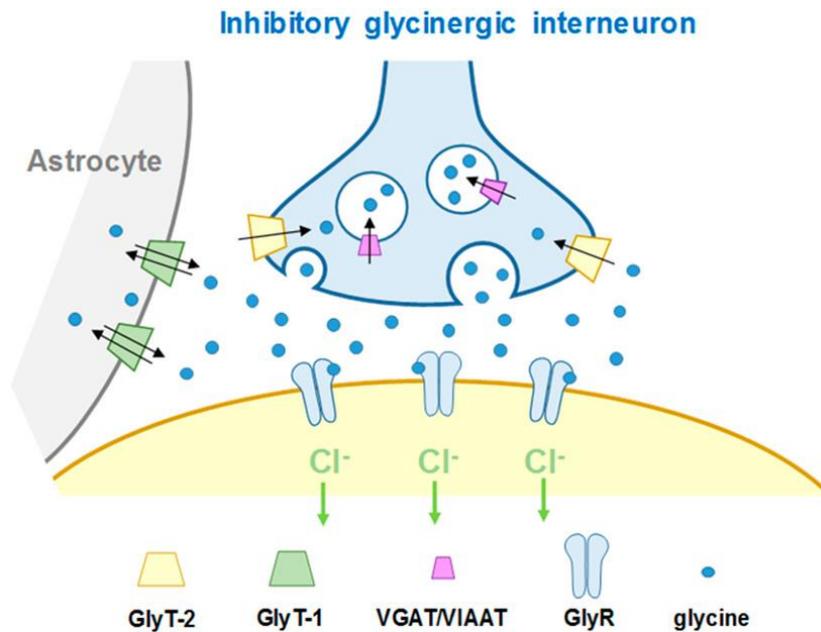


Figura 5. Sinapsis glicinérgica. El esquema resume los componentes principales de la sinapsis glicinérgica, en la cual la apertura de GlyR postsinápticos genera un influjo de iones cloruro, logrando hiperpolarizar el potencial de membrana. Los roles de los transportadores de glicina GlyT1 y GlyT2, así como también del transportador vesicular VGAT/VIAAT, son presentados. Extraído desde Cioffi et al., 2018.

La subunidad $\alpha 1$ se encuentra altamente expresada en médula espinal y tronco encefálico a partir de la tercera semana postnatal (Lynch, 2009). Esta

subunidad posee un rol fundamental en el control de la excitabilidad neuronal en el SNC, ya que su pérdida de expresión genera un fenotipo que a partir de la segunda semana postnatal desarrolla un deterioro progresivo caracterizado por rigidez muscular, temblores, marcha espástica y muerte (Kling et al., 1997). Coincidentemente, mutaciones a $\alpha 1$ GlyR en humanos originan la enfermedad conocida como hiperekplexia, la cual es un desorden motor caracterizado por rigidez muscular y respuestas de sobresalto exageradas (Bode & Lynch, 2014; Schaefer et al., 2013). La introducción de mutaciones puntuales encontradas en pacientes hiperekplexicos al gen que codifica la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en ratones generan fenotipos hiperekpléxicos (Bode & Lynch, 2014; Schaefer et al., 2013). En conjunto, estas evidencias demuestran el rol fundamental de esta subunidad en el control motor y el tono muscular. Finalmente, es importante destacar que estudios recientes han caracterizado la expresión y función de la subunidad $\alpha 1$ en el cerebro. De modo interesante, su expresión ha estado involucrada a la regulación de los circuitos de recompensa en el núcleo Accumbens y en el área tegmental ventral (Gallegos et al., 2019; Muñoz et al., 2020; Muñoz et al., 2018).

En contraste con la subunidad $\alpha 1$, la subunidad $\alpha 2$ del GlyR se encuentra ubicuamente expresada en estados embrionarios (Lynch, 2009), mientras que en estadios adultos se encuentra expresada en áreas cerebrales como hipocampo, corteza prefrontal y cerebro anterior (Chattipakorn & McMahon, 2002; McCracken et al., 2017; Xu & Gong, 2010). Ratones *knock-out* para la subunidad $\alpha 2$ sobreviven hasta edades adultas (Avila et al., 2013; Young-Pearse et al., 2006). Sin embargo, en estos animales se han detectado alteraciones cognitivas menores en el

aprendizaje (Pilorge et al., 2016), modificaciones en la migración de interneuronas corticales (Avila et al., 2013) y cambios en la morfología de neuronas somatosensoriales de la corteza cerebral (Morelli et al., 2017). Por otra parte, mutaciones puntuales en esta subunidad se han relacionado con desarrollo de autismo y epilepsia (Avila et al., 2013; Pilorge et al., 2016).

Por otra parte, la subunidad $\alpha 3$ del GlyR comienza a expresarse a partir de las dos semanas postnatales en retina, hipocampo, cerebro anterior y láminas superficiales de la medula espinal (Harvey et al., 2004; Lynch, 2009; McCracken et al., 2017). Similar a los animales *knock-out* para la subunidad $\alpha 2$, la inactivación genética de $\alpha 3$ genera ratones viables (Harvey et al., 2004). Sin embargo, los animales *knock-out* para la subunidad $\alpha 3$ presentan un ritmo respiratorio irregular (Manzke et al., 2010) y alteraciones en la audición (Tziridis et al., 2017). Particularmente, se ha determinado que alteraciones en el funcionamiento y/o en la expresión de $\alpha 3$ GlyR son relevantes para la generación y mantención de dolor crónico (Ahmadi et al., 2002; Harvey et al., 2004; Zeilhofer et al., 2018; Zeilhofer, Benke, et al., 2012). Ratones *knock-out* para la subunidad $\alpha 3$ presentan una recuperación más rápida de la hipersensibilidad a dolor generada por modelos de dolor inflamatorio comparados con ratones *wild type*, (Harvey et al., 2004). Además, la reciente generación de una línea de ratones “*knock-in*” que expresan la mutación S346A en el gen *Gla3* permitió el análisis directo de la relevancia de la fosforilación de este residuo en el contexto del dolor crónico (Werynska et al., 2021). Los experimentos de comportamiento mostraron que estos ratones poseen un desarrollo de hiperalgesia a dolor inflamatorio significativamente disminuida

(Werynska et al., 2021). En conjunto, estos resultados muestran que la subunidad $\alpha 3$ es relevante para funciones fisiológicas, tales como ritmo respiratorio y audición, como también en el procesamiento de señales nociceptivas en el contexto del dolor crónico.

Finalmente, la subunidad β del GlyR se encuentra expresada tanto en periodos pre y postnatales en todo el sistema nervioso central (Aguayo et al., 2004; Lynch, 2009; Malosio et al., 1991). Esta subunidad es necesaria para el reclutamiento de GlyRs en el espacio sináptico (Meyer et al., 1995). Mutaciones en esta subunidad producen fenotipos hiperekpléxicos, tanto en humanos como en ratones (Schaeffer et al., 2013; Bode et al., 2014), los cuales se caracterizan mayoritariamente por presentar disminuciones en la expresión de GlyRs en la membrana plasmática (Groemer et al., 2022; Piro et al., 2021), fallas en el control motor (Bode et al., 2014) y alteraciones en el procesamiento nociceptivo (Groemer et al., 2022). Además, al comparar las configuraciones del GlyR que contienen la subunidad β con sus contrapartes homopentaméricas han encontrado cambios funcionales, tales como la afinidad a ligando, en su cinética de apertura e incluso su farmacología (Acuña et al., 2016; Lynch, 2009; Muñoz et al., 2021).

A diferencia de los otros pLGICs de mamíferos, los GlyRs son los únicos que han permanecido con un desarrollo farmacológico menor. Actualmente, no existe ningún fármaco de uso clínico que tenga como blanco específico los GlyRs. Sin embargo, y en base a su relevancia en el dolor crónico, en los últimos años se han caracterizado un número creciente de nuevos moduladores glicinérgicos, los cuales, en algunos casos, poseen efectos analgésicos en modelos de dolor crónico *in vivo*

(Cioffi, 2018; Lara et al., 2020; Zeilhofer, Benke, et al., 2012; Zeilhofer et al., 2021). De este modo, y aunque aún no han sido desarrollados compuestos que posean una alta selectividad y especificidad hacia GlyRs, resulta de particular interés la investigación y el desarrollo de nuevos moduladores glicinérgicos, lo que podría originar herramientas terapéuticas alternativas para diversas patologías del SNC.

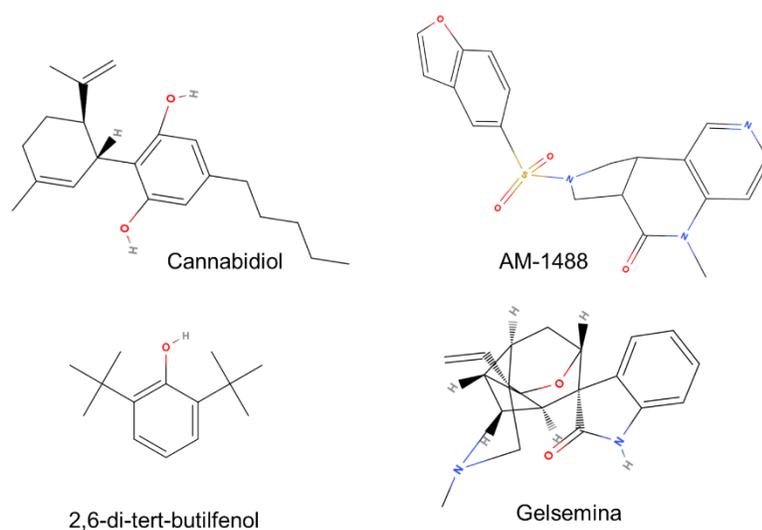


Figura 6. Moduladores glicinérgicos con actividad analgésica. Cannabidiol es un fitocannabinoide de origen natural que actúa como un modulador alostérico positivo de GlyRs (Xiong et al., 2012). El compuesto 2,6-di-tert-butylfenol es un análogo de propofol que no posee acciones en GABA_ARs, pero que posee actividad potenciadora en GlyRs homoméricos o heteroméricos en estado fosforilado (Acuña et al., 2016). AM-1488 es un modulador alostérico positivo sintético de alta potencia diseñado por la compañía farmacéutica AMGEN (Huang et al., 2017), mientras que gelsemina es un alcaloide procedente de las plantas del género *Gelsemium* que ejerce efectos mayoritariamente inhibitorios en GlyR de diferente configuración (Lara et al., 2016).

1.4. Aspectos generales de las plantas del género *Gelsemium* y de sus alcaloides.

Los extractos de las plantas del género *Gelsemium*, de la familia *Gelsemaceae*, se han utilizado tradicionalmente en la medicina popular para tratar la neuralgia, ciática, artritis reumatoide y diversas manifestaciones de dolor (Jin et al. 2014). Las primeras descripciones de su uso surgieron en el “*Canon de Materia Médica del Emperador Shennong*” (Shen-nong Ben-caojing) de principios del siglo III d.C., donde se describieron sus usos terapéuticos, y también su carácter altamente toxico (Jin et al., 2014; Peng et al., 2023). Anecdóticamente, estos extractos incluso se describen en la mitología china como causantes de la muerte del emperador Shennong. Actualmente, se conocen 5 especies distintas del género *Gelsemium* de las cuales destacan tres: *Gelsemium elegans*, nativa del sureste asiático, principalmente China, *Gelsemium sempervirens* comúnmente conocida como Jazmín amarillo, distribuida desde Texas hasta México y Guatemala, y *Gelsemium Rankinii* nativas del sureste de Estados Unidos (Dutt, Thakur, et al., 2010; Zhang & Wang, 2015).

A través de años, diferentes estudios han descrito diversos efectos para los extractos de esta planta, los que incluyen efectos terapéuticos contra diversas patologías (Jin et al., 2014; Peng et al., 2023). Sin embargo, el uso clínico de los extractos de *Gelsemium* es bastante limitado debido a su alta toxicidad, lo que incluye un decaimiento en la actividad motora y ritmo respiratorio, temblores corporales, convulsiones e incluso la muerte por asfixia. En la actualidad se siguen

reportando casos de envenenamiento (Lai & Chan, 2009; Qu et al., 2021) y contaminación de alimentos con compuestos de *Gelsemium* (Yang et al., 2020). A pesar de su estrecho margen terapéutico, estudios han descrito acciones biológicas beneficiosas en humanos y animales, como, por ejemplo, acciones antitumorales, ansiolíticas, antiinflamatorias, y antinociceptivas (Bousta et al., 2001; Dutt, Dhar, et al., 2010; Dutt, Thakur, et al., 2010; Huang et al., 2010; Jin et al., 2014; Lin et al., 2021; LinZhong, 1988; Magnani et al., 2010; Marzotto et al., 2014; Peng et al., 2023; Tan et al., 1988; Vitet et al., 2018; Y. K. Xu et al., 2012; Zhang & Wang, 2015).

La actividad biológica terapéutica de los extractos de *Gelsemium* ha promovido investigaciones que han determinado su composición química. Se han encontrado compuestos de diferente naturaleza, como, por ejemplo, esteroides, coumarinas, iridoides y alcaloides. Este último grupo ha mostrado una interesante diversidad química, ya que se han encontrado alrededor de 121 tipos diferentes de alcaloides presentes en las raíces, hojas y tallos de este tipo de planta (Jin et al., 2014). De esta amplia diversidad química, más de 80 compuestos son alcaloides que incluyen grupos indol y oxindol, los cuales se han clasificado en seis tipos de acuerdo con su estructura química. Estos tipos llevan el nombre del alcaloide más abundante y representativo: tipo gelsemina, tipo koumina, tipo gelsedina, tipo humantenina, tipo yohimbano y tipo sarpagina (Liu et al., 2017). A partir de estos hallazgos, se ha logrado purificar y caracterizar diversos alcaloides de la planta *Gelsemium*, los que han logrado replicar, en gran parte, las acciones biológicas beneficiosas previamente reportadas por los estudios en extractos. Al igual que estos efectos benéficos, se han logrado reproducir sus perfiles toxicológicos y

relacionarlos con los efectos nocivos de las plantas y de sus extractos (Li et al., 2022; Pedroni et al., 2023; Peng et al., 2023; Rujjanawate et al., 2003). En general, los compuestos activos encontrados en mayor concentración en las plantas y extractos, y, por ende, los más estudiados, son: gelsemina, koumina, gelsevirina y gelsenicina, también conocida como humantenmina (Jin et al., 2014). Por estas razones, en este trabajo nos centramos en estos cuatro alcaloides, de los cuales detallaremos sus características más relevantes a continuación.

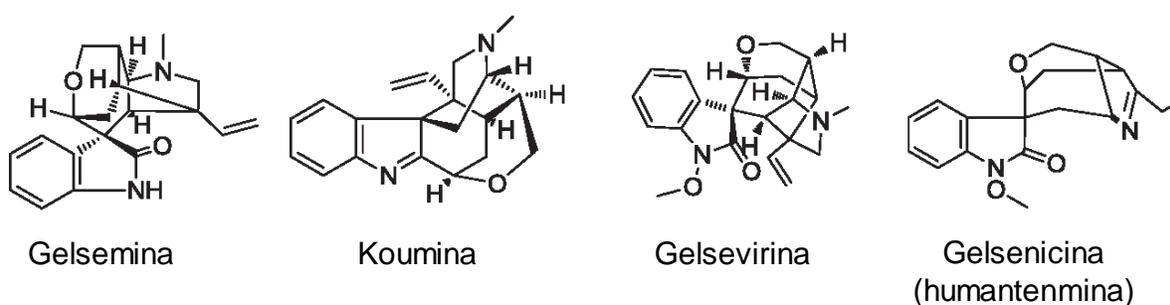


Figura 7. Alcaloides prominentes de las plantas de *Gelsemium*. El alcaloide gelsemina es la molécula representativa de los alcaloides del tipo gelsemina, mientras que koumina es el compuesto prototípico de los de tipo koumina. Gelsevirina está clasificada como un alcaloide adicional del tipo gelsemina, mientras que gelsenicina pertenece al grupo de alcaloides del tipo gelsedina. Adaptado de Zhang & Wang, 2015.

1.4.1. Gelsemina.

Como se mencionó anteriormente, gelsemina es el alcaloide más abundante en la planta *G. sempervirens* y el segundo en abundancia en *G. elegans*. Además, fue el primer alcaloide del género aislado en 1959. Posteriormente se encontraron dos isómeros ópticos en su aislación (Lin et al., 2019).

Se han descrito diversas acciones biológicas beneficiosas y tóxicas de este alcaloide. Se han descrito diversos efectos beneficiosos, que van desde efectos antihiperlipidémicos (T. Wu et al., 2015) y antioxidantes (Lin et al., 2015; T. Wu et al., 2015; Ye et al., 2018) a efectos neuroprotectores frente a tratamientos con el oligómero A β (Chen et al., 2020). De modo interesante, otros investigadores han reportado efectos analgésicos y ansiolíticos en modelos murinos. Estudios de comportamiento en animales han demostrado que gelsemina es capaz de revertir la hipersensibilidad a estímulos térmicos y mecánicos en diversos modelos de dolor, como, por ejemplo, dolor inducido por formalina (Zhang et al., 2013), dolor en modelo de cáncer de hueso (Zhang et al., 2013) y dolor neuropático (Shoib et al., 2019; Y. E. Wu et al., 2015; Zhang et al., 2013). También se ha descrito su acción ansiolítica en modelos de rata (Meyer et al., 2013) y ratón (Liu et al., 2013), la cual fue comparable a la acción de la BDZ clásica, diazepam. Por otra parte, también se ha descrito la intoxicación por gelsemina, la cual se caracteriza por la presencia de disnea, convulsiones, temblores, paro respiratorio, e incluso la muerte. En estos experimentos, se ha determinado que la LD₅₀ para ratones es de 56,2 mg/kg mediante administración intraperitoneal (Jin et al., 2014; Lin et al., 2021).

Con respecto a los mecanismos involucrados en sus acciones benéficas, la actividad ansiolítica y analgésica de este alcaloide han sido relacionados con la unión y activación de GlyRs (Liu et al., 2013; Shoaib et al., 2019; Venard et al., 2008; Zhang & Wang, 2015). Por una parte, se ha encontrado que la administración de estriquina, en conjunto con gelsemina, bloquea el efecto analgésico en roedores (Zhang et al., 2013; Shoaib et al., 2019). Similares resultados fueron obtenidos en estudios relacionados a sus acciones ansiolíticas, ya que diferentes dosis de estriquina demostraron ser capaces de revertir el efecto ansiolítico de gelsemina (Liu et al., 2013). En estos estudios se ha investigado la capacidad de gelsemina de unirse a los GlyRs en experimentos de unión utilizando ^3H -estriquina. Utilizando homogenizados de médula espinal de ratas con ^3H -estriquina y diferentes concentraciones de gelsemina, se determinó que gelsemina posee una K_i de 21.9 μM , determinándose que gelsemina desplaza de manera competitiva a estriquina (Zhang et al., 2013). Basados en esta evidencia, este grupo de autores propuso que los efectos ansiolíticos y analgésicos de gelsemina son mediados por la activación directa del GlyR (Liu et al., 2013; Shoaib et al., 2019; Venard et al., 2008; Zhang et al., 2013; Zhang & Wang, 2015). Sin embargo, estudios electrofisiológicos que evaluaron la función de diferentes configuraciones del GlyRs han determinado que gelsemina es principalmente un inhibidor competitivo del GlyR, sin ninguna actividad agonista detectable (Lara et al., 2016). De modo interesante, estos estudios mostraron que gelsemina posee un efecto bifásico exclusivamente en GlyRs compuestos de la subunidad $\alpha 1$. A concentraciones entre 0.01 – 50 μM del alcaloide, se observó una potenciación de las corrientes evocadas por glicina, con un aumento

máximo entorno al 60% con 10 μ M. A concentraciones mayores de 50 μ M, el alcaloide inhibió las corrientes evocadas, con una inhibición máxima entorno al 80% con 300 μ M. Interesantemente, la modulación positiva de gelsemina fue completamente anulada con la presencia de la subunidad β , convirtiendo a la conformación $\alpha 1\beta$ en insensible a concentraciones menores de 50 μ M de gelsemina, y solo inhibiéndose a concentraciones mayores. Por otra parte, los $\alpha 2$ y $\alpha 3$ GlyRs de configuración homo y heteropentaméricos fueron inhibidos por gelsemina (Lara et al., 2016).

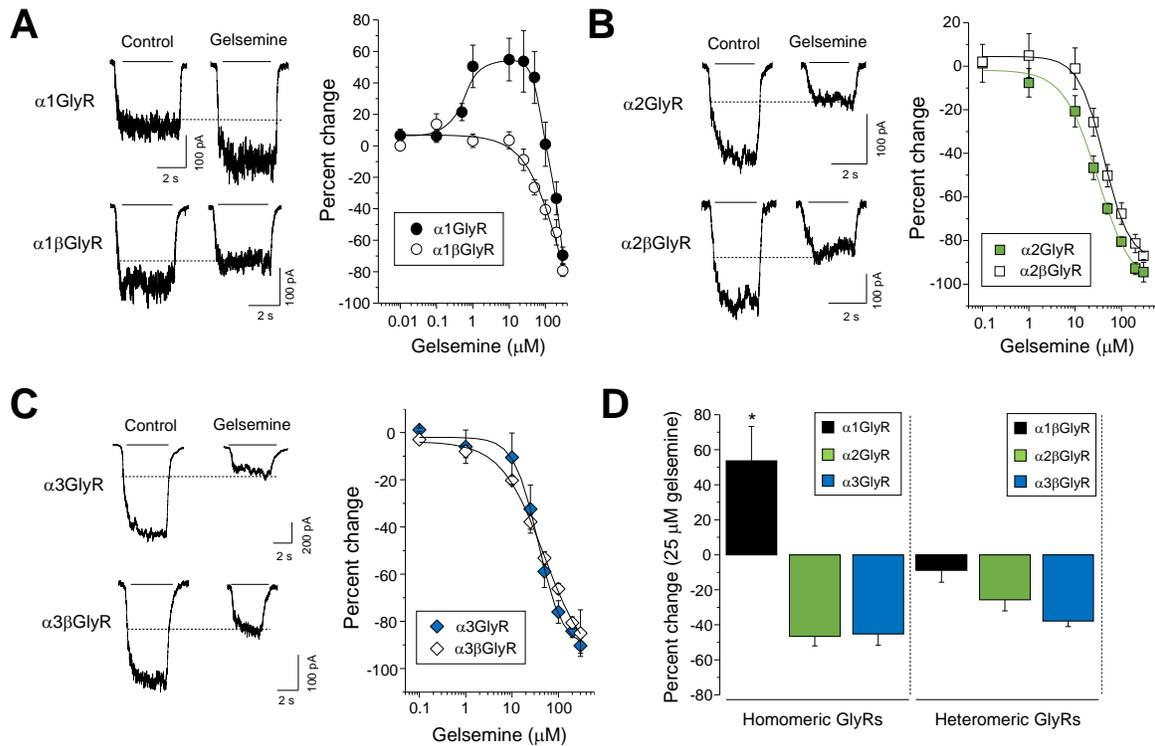


Figura 8. Modulación de GlyRs por el alcaloide gelsemina. A-C. Los trazos de corriente y las curvas concentración respuesta muestran los efectos de gelsemina (0.01-300 μ M) en GlyRs compuestos de subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de configuración

homo y heteropentaméricos. **D.** El gráfico resume de los efectos de gelsemina (25 μM) en GlyR homoméricos y heteroméricos (Lara et al., 2016).

Los resultados de estos experimentos funcionales son interesantes, ya que correlacionan directamente con la sintomatología de toxicidad de gelsemina, tales como el paro respiratorio y convulsiones (Rujjanawate et al., 2003). Sin embargo, al mismo tiempo, estos resultados son controversiales, ya que no son coherentes con los efectos ansiolíticos y analgésicos de gelsemina y el rol propuesto para los GlyRs (Lara et al., 2016; Shoab et al., 2019; Venard et al., 2008; Zhang & Wang, 2015). Los resultados electrofisiológicos son coherentes con los ensayos de unión previamente mencionados, junto con la similitud estructural y funcional que comparte la estricnina con la gelsemina. Estas evidencias, en conjunto, demuestran que este alcaloide es un antagonista competitivo del GlyRs. Sin embargo, los efectos bifásicos de la gelsemina en el $\alpha 1$ GlyRs dejan abierta la posibilidad de que exista más de un sitio de unión para el alcaloide, que pudiera mediar los efectos potenciadores de la gelsemina en esta conformación en comparación con las demás.

Por otra parte, las investigaciones realizadas por Lara y colaboradores (Lara et al., 2016) exploraron posibles efectos de gelsemina en la sinapsis glicinérgica y glutamatérgica, encontrando que el alcaloide, a concentraciones menores a las que logran una inhibición significativa de los GlyRs, logró disminuir significativamente la frecuencia de los eventos glicinérgicos y glutamatérgicos sin cambios mayores en la amplitud. Estos resultados sugieren que gelsemina podría actuar a nivel presináptico a través de interacciones con blancos moleculares no identificados

hasta ahora. En conjunto, estas evidencias sugieren que el alcaloide gelsemina posee diferentes proteínas blanco a nivel sináptico, por lo que estudios adicionales son necesarios.

1.4.2. Gelsevirina.

Gelsevirina es un alcaloide de tipo gelsemina con un grupo metoxi en el átomo de nitrógeno en la posición 1 (Zhang & Wang, 2015). Este alcaloide ha sido recientemente relacionado a efectos protectores frente a procesos inflamatorios desarrollados en sepsis, osteoartritis e isquemia cerebral. En estos estudios se ha encontrado, por ejemplo, que gelsevirina disminuyó la respuesta inflamatoria causada por IL-1 β de cultivos de condrocitos (Feng et al., 2022). También se ha encontrado que, en ratones expuestos a sepsis inducida por ligadura y punción cecal, progresaban con un periodo de supervivencia significativamente mayor luego de la administración post-operatoria de gelsevirina (Chen et al., 2023). En ambos estudios se apunta como principal mecanismo de acción la unión de este alcaloide con la proteína estimuladora de genes de interferón (de sus siglas en inglés STING), provocando su inactivación y ubiquitinación (Cheng et al., 2023). Adicionalmente, se ha evaluado el efecto de gelsevirina en ratones con oclusión de la arteria cerebral media para evaluar su efecto protector en accidentes cerebrovasculares y se encontró que la administración de este alcaloide mejoró significativamente el volumen del infarto, la función neurobiológica, la apoptosis de neuronas (Xing et al., 2023). En este estudio se encontró que es capaz de regular negativamente la hiperactividad de la microglía, la generación de efectos inflamatorios, la disfunción mitocondrial, y la producción de ROS (Xing et al., 2023).

Por otra parte, y similar a gelsemina, gelsevirina se ha relacionado con efectos ansiolíticos. En experimentos de laberinto en cruz y de transición claro-oscuro con ratones se observó que la administración subcutánea de gelsevirina generó una disminución del comportamiento de ansiedad similares a los observados con gelsemina (Liu et al., 2013). De modo interesante, su efecto ansiolítico fue revertido con estricnina. A partir de estas evidencias se ha postulado que los mecanismos de acción involucrados a las acciones ansiolíticas de gelsevirina se inician con modulación directa del alcaloide sobre los GlyRs, Sin embargo, a la fecha, los efectos funcionales de este alcaloide en GlyRs no han sido determinados.

1.4.3. Koumina.

En la actualidad, se han aislado 16 alcaloides del tipo Koumina desde las plantas de *Gelsemium*. Koumina es el alcaloide más abundante de *G. elegans* (Jin et al., 2014; Sun et al., 2013). Este alcaloide fue purificado por primera vez en 1931, mientras su estructura fue determinada en 1981 (Khuong-Huu et al., 1981). De modo similar a los otros alcaloides descritos anteriormente, se han descrito varias propiedades beneficiosas para koumina. A su vez, se ha determinado que koumina presenta una toxicidad relativamente menor con respecto a otros alcaloides, con una LD₅₀ de 99 kg/mg mediante administración intraperitoneal en ratones (Jin et al., 2014).

La actividad benéfica de koumina incluye efectos antiproliferativos (Wu et al., 2006), antiinflamatorios (Gui-lin et al., 2022) y hepatoprotectores (Yuan et al., 2019). Por ejemplo, koumina ejerció efectos antitumorales sobre líneas celulares

cancerígenas como HepG2, de carcinoma hepatocelular (Huang et al., 2010) y MCF-7, de cáncer de mamas (Zhang et al., 2015). Otros autores han descrito un efecto citoprotector de este alcaloide frente a α -sinucleína, uno de los principales agentes patológicos de la enfermedad de Parkinson (Ghanem et al., 2021) . Este estudio demostró que koumina fue capaz de inhibir la agregación de α -sinucleína y la subsecuente generación de fibrillas (Ghanem et al., 2021). Por otra parte, otros grupos de investigadores han descrito su actividad antiinflamatoria, donde, por ejemplo, se ha encontrado que es capaz de regular la polarización de macrófagos (Jin et al., 2022; Lin et al., 2023) y de células tipo T (Yang et al., 2022) y de tipo B (Lin et al., 2022) en modelos animales de sepsis y artritis. Además, las acciones antiinflamatorias de koumina se han asociado con disminución de IL-1 β y TNF- α en modelos de artritis inducida por colágeno (Yang et al., 2016). Finalmente, y posiblemente relacionado a sus efectos antiinflamatorios, otros reportes mostraron que koumina promovió efectos hepatoprotectores en modelos murinos de hepatitis autoinmune (Que et al., 2023) y modelos de hígado graso no alcohólico (Yue et al., 2019).

De manera coincidente con la literatura enfocada en gelsemina, variados reportes han determinado que el alcaloide koumina ejerce efectos ansiolíticos en modelos murinos (Chen et al., 2017; Liu et al., 2013; Lu et al., 2023; Xiong et al., 2022) y efectos analgésicos en diferentes modelos de dolor, tales como dolor neuropático (Jin, He, et al., 2018b; Qiu et al., 2015; Xiong, You, et al., 2021; Y. Xu et al., 2012), inflamatorio (Xiong, Jin, et al., 2021; Y. Xu et al., 2012), diabético (Ling et al., 2014; Lu et al., 2023) y de dolor post operatorio (Xiong et al., 2017). Estos

efectos benéficos se han correlacionado con diferentes aristas de su mecanismo de acción. En primer lugar, se ha encontrado que koumina fue capaz de disminuir la activación de la microglía (Jin, He, et al., 2018a) y de disminuir la neuro inflamación mediada por astrocitos (Jin, Yue, et al., 2018). En segundo lugar, se ha sugerido que koumina fue capaz de regular positivamente los niveles de neuroesteroides como la alopreganalonona (Y. Xu et al., 2012) mediante el aumento de la expresión y la actividad de enzimas involucradas en su biosíntesis como 3α -HSOR (Qiu et al., 2015) y TSPO (Xiong, Jin, et al., 2021). Finalmente, en tercer lugar, algunos de estos estudios han propuesto como posible blanco de acción los GABA_ARs y GlyRs, ya que, por una parte, se ha observado que la administración de bicuculina revirtió la analgesia inducida por koumina en modelos murinos de dolor postoperatorio (Xiong et al., 2017). Por otra parte, de modo similar a lo observado en los estudios con gelsemina, se ha observado que estricnina fue capaz de bloquear sus efectos ansiolíticos (Liu et al., 2013) y analgésicos (Shoaib et al., 2019). A pesar de estas evidencias, a la fecha se desconoce si koumina es capaz de modular la actividad de GABA_ARs y GlyRs.

1.4.4. Humantenmina.

Humantenmina, también conocido como gelsenicina, se ha clasificado como un alcaloide tipo gelsedina y se ha descrito como el alcaloide presente en las plantas del género *Gelsemium* de mayor toxicidad (LD₅₀= 0.165 mg/kg en ratones por administración intraperitoneal) (Jin et al., 2014). Estudios toxicológicos han mostrado efectos principalmente neurológicos, mediante una fuerte inhibición del centro respiratorio, desencadenando insuficiencia respiratoria y la muerte (Jin et al.,

2014; Li et al., 2022). Actualmente, se desconocen los blancos moleculares involucrados en la toxicidad de este alcaloide. Sin embargo, estudios bioinformáticos recientes enfocados en explorar los mecanismos implicados en los efectos tóxicos de este alcaloide han determinado que humantenmina podría unirse al receptor de ácido N-metil-D-aspartato (NMDAR) (Huang et al., 2021) y de acetilcolina (AChRs) (Pedroni et al., 2023). Por otra parte, otros grupos de investigación han buscado posibles antídotos para la intoxicación por humantenmina, donde se ha encontrado que la administración de NMDA mejora la tasa de supervivencia de animales envenenados con humantenmina (Pedroni et al., 2023). De manera interesante, y aunque no coincidente con la evidencia anterior, otros reportes han encontrado que flumazenil (Li et al., 2022; Yang et al., 2020) y diazepam, dos ligandos GABAérgicos de efectos contrapuestos, mejoraron significativamente la supervivencia y la sintomatología de humantenmina en ratones (Li et al., 2022). A pesar de todos estos antecedentes sobre su alta toxicidad, también se han reportado efectos analgésicos (Liu et al., 2011) e anti-inflamatorios (Liu et al., 2011; Xu et al., 2023) mediados por humantenmina. Interesantemente, uno de estos estudios sugiere que los efectos benéficos de este alcaloide pudieran estar mediados por un aumento en la expresión de GlyRs en la medula espinal (Xu et al., 2023). De manera similar a lo descrito para koumina y gelsevirina, a la fecha es desconocido si humantenmina modula directamente la función de GABA_ARs y GlyRs.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. Hipótesis.

Los antecedentes presentados en la sección anterior sugieren que los GABA_ARs y GlyRs son blancos moleculares de diversos alcaloides de *Gelsemium*. Sin embargo, la información a la fecha no permite definir con claridad la relevancia de GABA_ARs y GlyRs en las acciones terapéuticas y tóxicas de estos alcaloides. En particular, los efectos funcionales de gelsemina solo se han estudiado en profundidad en GlyRs, por lo que la sensibilidad de GABA_ARs a este alcaloide no ha sido investigada. Por otra parte, no existen estudios electrofisiológicos que determinen las acciones directas de otros grupos de alcaloides de *Gelsemium* en la función de los GABA_ARs y los GlyRs. Sumados a estas interrogantes, los mecanismos involucrados en la modulación sináptica ejercida por gelsemina, y potencialmente por alcaloides adicionales, aún no están determinados. Finalmente, estudios moleculares y bioquímicos que confirmen los sitios de unión de estos alcaloides en GABA_ARs y los GlyRs no han sido reportados. En base a estas interrogantes, se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

“Alcaloides provenientes de plantas del género Gelsemium regula directamente la función de GABA_ARs y GlyRs, lo que modula la función sináptica de neuronas en cultivo”

2.2 Objetivo General.

Determinar las acciones de los cuatro principales alcaloides provenientes de plantas del género *Gelsemium* (gelsemina, gelsevirina, koumina y humantenmina) en la función de GABA_ARs y GlyRs, y en la función sináptica de neuronas corticales en cultivo.

2.3 Objetivos específicos:

Objetivo específico 1. Evaluar la actividad funcional de gelsemina, gelsevirina, koumina y humantenmina sobre GABA_ARs.

Objetivo específico 2. Evaluar la actividad funcional de gelsevirina, koumina y humantenmina sobre GlyRs.

Objetivo específico 3. Determinar los sitios de unión putativos para los alcaloides de *Gelsemium* en GlyRs y GABA_ARs.

Objetivo específico 4. Determinar las acciones de alcaloides de *Gelsemium* en la función sináptica de neuronas corticales en cultivo.

3. METODOLOGIA.

3.1. Reactivos.

Glicina y las sales necesarias para la preparación de soluciones electrofisiológicas fueron compradas en Sigma Aldrich (USA). Los alcaloides gelsemina, gelsevirina, humantenmina y koumina fueron adquiridas en AK Scientific (USA) o en ChemFaces (Wuhan, China). Diazepam fue adquirido en Laboratorio Chile. Estricnina fue comprada en AK Scientific Inc (USA). GABA, CNQX, D-AP5, Bicuculina, QX-314 y TTX fueron comprados en HelloBio Inc. (Bristol, UK). Soluciones stock de glicina, GABA, alcaloides, bloqueadores y otras moléculas fueron preparados en agua nano-pura o DMSO, de acuerdo con la información otorgada por el proveedor, alicuotadas y almacenadas a -20°C hasta el momento del experimento. En los experimentos de electrofisiología, la cantidad de DMSO no superó el 1% del volumen de la solución de trabajo.

3.2. Cultivo celular y transfección de células HEK293.

Se utilizaron células *Human Embryonic Kidney cells 293* (HEK 293, CRL-1573; *American Type Culture Collection*, USA), las cuales fueron cultivadas mediante protocolos previamente descritos (Groot-Kormelink et al., 2002) en *Dulbecco's modified Eagle médium* (DMEM, Corning®) con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, Gibco), en una incubadora termo regulada con 5% de CO₂ a 37°C. Las células fueron pasajeadas siguiendo procedimiento estándar que consiste en un lavado con buffer fosfato salino (PBS, Corning®), luego

disgregación mecánica con DMEM y siembra sobre *flask* de 100mm para mantener el stock de células y *flask* Nunclon® de 35 mm para ensayos de electrofisiología.

Para expresar GABA_AR y GlyR en células HEK293 se realizó la transfección química transitoria mediante el reactivo *Lipofectamine 2000* (ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. En resumen, se utilizó 0.8 µL de *Lipofectamine* por cada microgramo de plásmido a transfectar y se diluyeron ambos reactivos en Opti-MEM (Gibco™). Luego se incubó la mezcla por 20 minutos a temperatura ambiente, se agregó mediante goteo suave sobre células en una confluencia del 50-60%. Finalmente se mantuvieron las células con el medio y condiciones de cultivo antes descrito por 12 a 48 horas.

Los vectores codificantes para las subunidades de GABA_AR y GlyR utilizados en este trabajo son especificados en la Tabla 1. Para el caso de los registros electrofisiológicos que requirieron expresión de GlyR homopentaméricos, se transfectaron 0.5 µg del plásmido para la subunidad de interés (α 1,2 o 3) y 0.5µg de GFP como gen reportero. En el caso de los GlyR heteropentaméricos se transfectaron 0.5 µg de la subunidad α correspondiente y 2.5 µg de la subunidad β . Para los registros electrofisiológicos que necesitaron la expresión de $\alpha_x\beta_x$ GABA_AR, se transfectaron 1 µg de la subunidad α y 1 µg de la subunidad β correspondientes para cada experimento, más 0.5 µg de GFP. Para la configuración $\alpha_x\beta_x\gamma_2$ GABA_AR se transfectaron 0.5 µg de la subunidad α , 0.5 µg de β correspondientes, más 2.5 µg de γ_2 , el cual se encuentra subclonado en un vector bicistrónico que expresa la GFP.

Tabla 1. Plásmidos utilizados para el estudio de GABA_AR y GlyRs expresados en células HEK293.

Proteína	Vector	Referencia
GABA_AR		
<i>α1</i>	pBC12/CMV	(Benson et al., 1998)
<i>α2</i>	pBC12/CMV	(Benson et al., 1998)
<i>α3</i>	pBC12/CMV	(Benson et al., 1998)
<i>α5</i>	pCI	(Marileo et al., 2022)
<i>β2</i>	pcDNA3.1	(Moraga-Cid et al., 2011)
<i>β3</i>	pcDNA3.1	(Benson et al., 1998)
<i>γ2</i>	pIRES-eGFP	(Moraga-Cid et al., 2011)
GlyR		
<i>α1</i>	pCI	(Yevenes et al., 2010)
<i>α2</i>	pCI	(Yevenes et al., 2010)
<i>α3</i>	pCI	(Lara et al, 2016)
<i>β</i>	pCI	(Lara et al, 2016)
Quimera α1-α2	pCI	(Yevenes et al., 2010)
Quimera α1-α3	pCI	(Yevenes et al., 2010)
Quimera α3-α1	pCI	(Yevenes et al., 2010)
Quimera α2-α1	pCI	(Yevenes et al., 2010)
α1(F63A)	pCI	Mutagenex Inc.
α1(G106E)	pCI	Mutagenex Inc.
GFP	pGreen-lantern	(Yevenes et al., 2010)

3.3. Registros electrofisiológicos en células HEK293.

Los registros realizados en HEK293 fueron realizados mediante protocolos previamente descritos (Acuña et al., 2016; Moraga-Cid et al., 2015). Los registros fueron realizados en la conformación de célula completa en modalidad *Voltage clamp* a -60 mV a temperatura ambiente. Las pipetas de vidrio fueron generadas a partir de capilares de borosilicato (Sutter Instruments, USA) con un pulidor vertical PC-100 (Narishige group) y pulidas con una microforja hasta obtener una resistencia de 3 – 5M Ω . Las pipetas fueron llenadas con solución interna la cual contiene (en mM): 120 KCl, 10 BAPTA, 10 HEPES, 4 MgCl₂, 0.5 GTP, 2 ATP, pH ajustado a 7.4 y osmolalidad 290-310 mOsm/Kg. Las células son bañadas en una solución externa normal (SEN) que contiene (en mM): 140 NaCl, 5.4 KCl, 2.0 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, pH 7.4 y osmolalidad 310-320 mOsm/kg.

La adquisición y digitalización de los datos electrofisiológicos se realizó con un amplificador Axopatch 200B, una Digidata 13222A y el programa pClamp 9 (Molecular Devices, USA). El análisis de los registros fue realizado utilizando el programa Clampfit 10. (Molecular Devices, USA). La aplicación externa de los ligandos y moduladores fue realizada mediante una línea de perfusión alimentada por gravedad, utilizando líneas de perfusión de 200 μ m de diámetro. El efecto de los alcaloides y moduladores utilizados sobre las corrientes evocadas por ligandos fue evaluado a través del porcentaje de cambio normalizado (Lara et al., 2016; Marileo et al., 2023). La actividad de los agonistas y otros parámetros farmacológicos fueron calculadas mediante curvas concentración respuesta de corriente normalizada, las cuales fueron calculadas usando la ecuación: Corriente

normalizada (%) = $100 \times (I/I_{\max})$, donde I es la corriente activada por una concentración del ligando subsaturante, e I_{\max} es la máxima amplitud de corriente obtenida a una concentración saturante de ligando. Además, se obtuvo desde el ajuste de la curva de concentración respuesta los parámetros EC_{50} y número de Hill (n_H) mediante la ecuación $I_{\text{Agonista}} = I_{\max}[C_{\text{Agonista}}]^{n_H}/([C_{\text{Agonista}}]^{n_H} + (EC_{50})^{n_H})$. Donde I_{Agonista} es la corriente evocada en presencia a determinada subsaturante concentración del agonista y EC_{50} es la concentración requerida para obtener la mitad de la respuesta máxima. La actividad de los moduladores se evaluó mediante la obtención del porcentaje de cambio, el cual se calculó por la siguiente ecuación; $\text{Porcentaje de Cambio} = 100 \times ((I_{\text{modulador}} - I_{\text{Agonista}})/I_{\text{Agonista}})$, donde I_{Agonista} es la amplitud de la corriente evocada por la concentración de agonista control (EC_{10-20}), $I_{\text{modulador}}$ es la corriente evocada por el agonista en presencia de una determinada concentración del modulador. Por último, a partir de los datos de EC_{50} e IC_{50} , se calculó la constante de unión estimada para cada alcaloide (K_b), utilizando la fórmula de Cheng-Prusoff, $K_b = IC_{50}/((2 + (C_{\text{Agonista}}/EC_{50})^{n_H})^{1/n_H} - 1)$.

3.4. Cultivos neuronales.

Los protocolos para el uso y de animales de experimentación fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción (código de protocolo 1170252 aprobado el 06.01.2017 y CEBB944-2021 aprobado el 28.05.2021). Se siguieron las guías y protocolos éticos de cuidado de animales de experimentación establecidos por NIH (National Institutes of Health, Maryland, USA). Se utilizaron ratones C57BL/J6 que fueron mantenidos en cajas en grupos de 2 a 4, en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*.

Para la realización de los cultivos primarios se utilizó un total de 20 hembras gestantes.

Para este trabajo se utilizaron cultivos neuronales de corteza, los cuales fueron preparados siguiendo protocolos descritos, con algunas modificaciones (Lara et al., 2016; Marileo et al., 2022; Yevenes et al., 2003). Para los cultivos corticales se utilizaron hembras con 18.5 días de gestación.

En primer lugar, se realizó la eutanasia de una hembra preñada mediante la inhalación de CO₂ y posterior dislocación cervical. Posterior a eso se realizó inmediatamente la remoción de los embriones, los cuales se decapitaron y se realizó la disección del área de interés. Luego el tejido diseccionado fue triturado mecánica y enzimáticamente para luego ser sembrados a una confluencia de 320.000 células/vidrio, en vidrios de 18 mm de diámetro tratados previamente con *poly-L-lysine* (Sigma #P4707). Las células sembradas fueron mantenidas en medio *plating*, el cual contiene MEM/EBBS (Hyclone®, #SH30244.02) suplementado con 10% suero de caballo (Gibco #26050-088), 1% glutamina (Gibco #25030-081) y 1% DNase I (Roche, #11284932001). A las 24 horas de la siembra se reemplazó el medio *plating* por el doble de volumen de medio *feeding*, el cual contiene MEM/EBBS suplementado con 4% v/v suero fetal bovino (Gibco #16000-044), 4% v/v suero de caballo y 0.4% v/v de una mezcla de nutrientes y factores de crecimiento previamente estandarizada (Tapia & Aguayo, 1998). Los cultivos fueron incubados por 14 a 21 días de maduración a 37°C en una atmosfera saturada de H₂O y 5%CO₂ hasta su utilización.

3.5. Cuantificación relativa de expresión de subunidades de GABA_AR.

Para evaluar la expresión de las subunidades de GABA_AR de interés en neuronas corticales de ratón en cultivo, se purificó ARN total a partir de cultivo primario de neuronas corticales homogenizando el plato de cultivo con 1 mL de Trizol® (Gibco). Posteriormente se agregó 200 µL de cloroformo (Merck) para aislar el ARN total de la fase orgánica, para luego precipitar con isopropanol (Merck). El pellet obtenido se lavó con etanol (70%) (Merck) y se disolvió en agua libre de ARNasa. Finalmente se cuantificó la pureza y la concentración de ARN total utilizando el equipo Infinite® 200 PRO NanoQuant. Para la retro-transcripción del ARN total a cDNA se utilizó el kit AffinityScript QPCR cDNA Synthesis (Agilent technologies, CAT# 600559). Para realizar la qPCR, se utilizó el kit Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent technologies, CAT# 600828) y el equipo Mx3000P QPCR System (Agilent technologies), el cual está acoplado al software MxPro QPCR (Agilent technologies). Los partidores utilizados se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Partidores utilizados para el estudio de expresión de ARNm de GABA_AR expresados en cultivo de neuronas corticales.

	Forward primer	Reverse primer	Referencia
α1	5'-gccccgagctgtgcaa-3'	5'-ggtccaggcccaaagatagtc-3'	(Linnemann et al., 2006)
α2	5'-acagtccaagccgaatgtcc-3'	5'-aacggagtcagaagcattgtaagt-3'	(Linnemann et al., 2006)
α3	5'-aacaaatctgtggaagtagcacagg-3'	5'-tctctgtcccaacaacatggcc-3'	(Linnemann et al., 2006)
α5	5'-gcagcttgaggactttccaatg-3'	5'-ggtaagcataactgccaatttca-3'	(Linnemann et al., 2006)

β2	5'-aggggctactttgggatttg -3'	5'-tctgtccaccgtctctttaacc-3'	(Szemes et al., 2013)
β3	5'-ttgcggagaagacagccaag-3'	5'-tgaacatccatcggtgctaataagg-3'	(Szemes et al., 2013)
γ2	5'-cttacattccctgcacactcatc-3'	5'-agattttctggctatggtgctt-3'	(Szemes et al., 2013)

El análisis de los datos se realizó en base a la expresión de RNA relativa del gen de interés al gen de referencia GAPDH, de acuerdo a la *formula expresión de RNA relativa* = $2^{-\Delta Ct}$, donde Ct es el ciclo umbral de aumento de fluorescencia, y en consecuencia $\Delta Ct = Ct(\text{gen de interés}) - Ct(\text{GAPDH})$.

3.6. Registros electrofisiológicos de neuronas en cultivo.

Los registros de corrientes evocadas por GABA fueron realizados utilizando condiciones similares a los registros de célula completa en células HEK293, con excepción de la adición de 300 nM de TTX a la solución externa. Para estudiar y aislar corrientes inhibitorias postsinápticas inhibitorias (mIPSCs) o excitatorias (mEPSCs) se siguieron protocolos que han sido previamente descritos (Lara et al., 2016). Las corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura GABAérgicas (GABA-mIPSCs) fueron aisladas farmacológicamente utilizando tetrodotoxina (TTX, 0.3μM), estricnina (STN, 2μM), CNQX (4μM) y ácido D(-)-2-amino-5-fosfovalérico (AP5, 50μM). Luego, para confirmar la naturaleza GABAérgicas de los eventos observados se utilizó bicuculina (5 μM), el cual es un antagonista competitivo de los GlyRs. De manera similar, para las corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura glicinérgicas (gly-mIPSCs) fueron aisladas farmacológicamente utilizando tetrodotoxina (TTX, 0.3μM), bicuculina (5μM), CNQX (4μM) y ácido D(-)-2-amino-5-

fosfovalérico (AP5, 50 μ M). Para aislar corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura se utilizó el siguiente coctel farmacológico: TTX (0.3 μ M), bicuculina (5 μ M) y estricnina (2 μ M). Luego, al final del registro se utilizaron los bloqueadores CNQX (4 μ M) y AP5 (50 μ M) para confirmar la naturaleza glutamatérgica de los eventos. Los eventos obtenidos tanto para las mIPSCs como las mEPSCs fueron analizados off-line utilizando los softwares Clampfit 10.1 (Molecular Devices) y MiniAnalysis 6.0.3 (Synaptosoft). Con estos softwares se calcularon la amplitud de los eventos, la frecuencia de los eventos, el *decay time* y el *rise time* en ausencia o presencia de moduladores.

3.7. Microfluorimetría de Ca²⁺ intracelular.

Debido a que el proceso de fusión vesicular y liberación de neurotransmisores comprende fluctuaciones dinámicas de Ca²⁺ en las neuronas, llevamos a cabo la evaluación del impacto potencial de los alcaloides en la actividad neuronal mediante el registro de señales espontáneas de Ca²⁺ intracelulares. Estos registros se obtuvieron mediante técnicas de microfluorimetría utilizando protocolos previamente descritos (Gavilan et al., 2019; González-Ramírez et al., 2018). Para estos análisis se utilizó la sonda FLUO-4-AMTM a 5 μ M (Invitrogen, MA, USA) con espectros de excitación/emisión 480nm/520nm. Esta sonda es capaz de atravesar la membrana plasmática y generar una señal fluorescente proporcional a los niveles de Ca²⁺ en el citosol. Inicialmente, la sonda se incubó durante 20 minutos en PBS utilizando condiciones de incubación estándar. Posteriormente, las células se lavaron 20 minutos con PBS y 3 veces con SEN. Para la adquisición de los datos se utilizó un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon, Tokio, Japón)

acoplado a una cámara EMCCD Ixon+ (Andor, Belfast, Irlanda). El control de iluminación fue realizado por medio de un Shutter Lambda 10-B (Sutter Instrument Co, Novato, CA, USA). La fuente de iluminación fue una lámpara de arco de mercurio, utilizando un filtro de excitación de 480nm y un filtro de emisión de 520nm. La adquisición de datos, manejo de cámara y *shutter*, y análisis de fluorescencia se llevaron a cabo con el programa Imaging Workbench 6.0 (Indec BioSystems, Santa Clara, CA, USA). Cada imagen se midió la fluorescencia cada 30 s, con 200 ms de exposición. Para todas las grabaciones, primero registramos 10 minutos de condición basal. Después de este período, se aplicó de forma aguda cada molécula mediante perfusión al cultivo y se registraron durante otros 10 minutos más. Además, las señales de Ca^{2+} se registraron seleccionando una región particular de interés en las neuronas y se expresaron como $\Delta F/F$, a partir de la ecuación $\Delta F/F = (F_{(t)} - F_0)/F$, donde ΔF es la diferencia entre las fluorescencia de la región de interés en diferentes momentos ($F_{(t)}$), y fluorescencia en el tiempo inicial (F_0), mientras que F es la fluorescencia de fondo.

3.8. Análisis estadístico.

La normalidad se verificó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk o D'Angostino Pearson según el tamaño de la muestra. Todos los resultados se presentan como promedio \pm SEM. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con Origin (versión 6.0 u 8.0) y GraphPad Prism 6. Los valores de $p < 0.05$, $p < 0.001$ y $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente diferentes. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante T-test pareados con corrección de Welch, no pareados o con ANOVA unidireccional con post hoc de

Bonferroni según corresponda. Las comparaciones estadísticas de distribuciones de probabilidad acumulada se realizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S).

4. RESULTADOS.

4.1. Modulación de GABA_ARs recombinantes y nativos por gelsemina.

Estudios anteriores demostraron que gelsemina generó inhibición de la función de los GlyR (Lara et al., 2016). Es desconocido si este alcaloide es capaz de modular funcionalmente de GABA_ARs. Los estudios realizados por Liu y colaboradores en el año 2013 compararon las acciones ansiolíticas de gelsemina y diazepam en roedores, sugiriendo que gelsemina posee efectos similares a los descritos para las BDZs, por lo cual, se ha propuesto que el mecanismo de acción esta mediado por GABA_ARs. Para investigar directamente esta interrogante, se examinaron los efectos de gelsemina en los GABA_ARs sensibles a BDZ más abundantes en el CNS a través de la técnica de *patch-clamp* en modalidad célula competa (Fritschy, 2015; Fritschy & Mohler, 1995; Rudolph & Mohler, 2004). Para ejecutar estos experimentos, en una primera instancia se analizó la sensibilidad a GABA de los GABA_ARs de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ recombinantes expresadas en células HEK 293 (Tabla 3 y Figura 8). Los resultados fueron comparables a los obtenidos por otros investigadores (Benson et al., 1998).

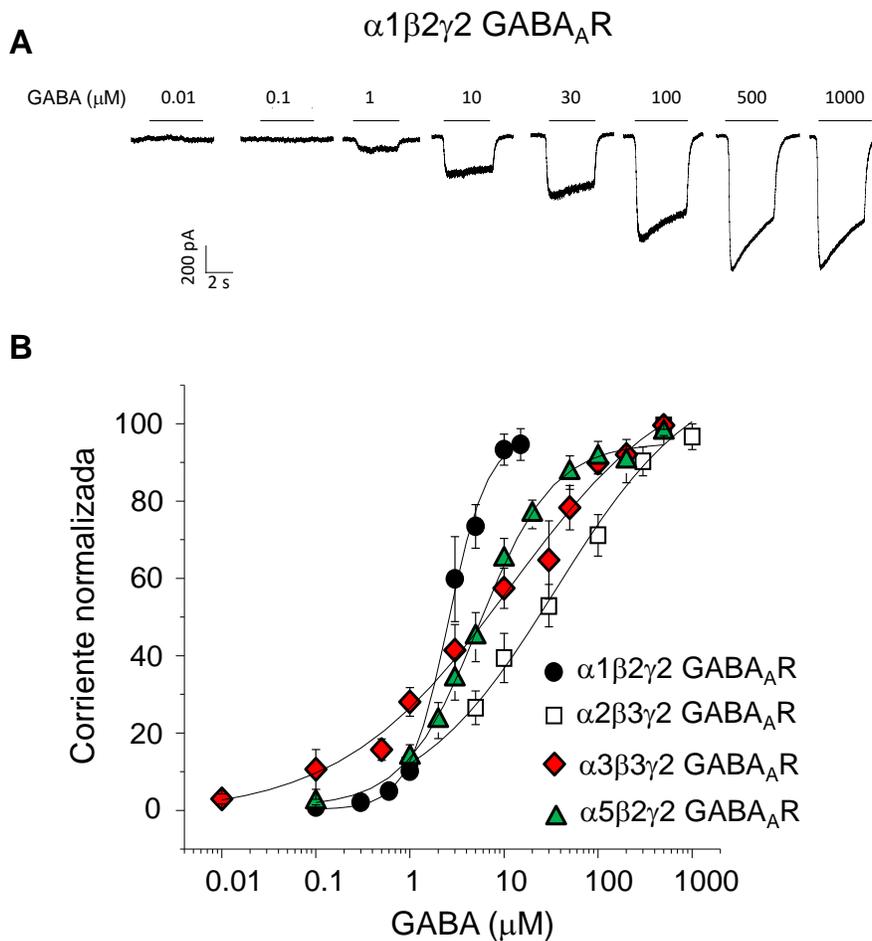


Figura 9. Sensibilidad a GABA de GABA_ARs recombinantes sensibles a BDZ expresados en células HEK293. A. Trazos de corriente representativos obtenidos tras la aplicación de GABA (0.01 – 1000 μM) a una célula HEK293 que expresó GABA_ARs de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. **B.** Curvas de concentración respuesta a GABA de $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ GABA_ARs expresadas en HEK293. Los datos corresponden a promedios \pm SEM de 6 a 8 células.

Tabla 3. Propiedades farmacológicas de GABA_ARs recombinantes sensibles a BDZ expresados en células HEK293.

GABA_AR	EC₅₀ (μM)	n_H	I_{max}(pA)	n
α1β2γ2	3.2±0.2	1.8±0.2	3792±257	6
α2β3γ2	29.8±10.1	0.6±0.1	1958±371	7
α3β3γ2	12.4±5.5	0.5±0.1	2227±475	6
α5β2γ2	5.4±0.3	1.10±0.1	1428±302	8

Posterior a esta caracterización, se evaluaron los posibles efectos directos de gelsemina sobre GABA_ARs en ausencia de su agonista natural, GABA. Para ello, se aplicó 300 μM de gelsemina a los GABA_ARs de configuración α1β2γ2, α2β3γ2, α3β3γ2 y α5β2γ2 (Figura 9). La aplicación de gelsemina en ausencia de GABA no generó ningún cambio en la línea de base de nuestros registros electrofisiológicos, lo que sugiere la ausencia de actividad agonista (α1β2γ2; 1.2±1.2% (n=6), α2β2γ2; 1.4±1.3% (n=6), α3β3γ2; 1.6±0.8% (n=6) y α5β2γ2; -0.2±1.0 (n=6)).

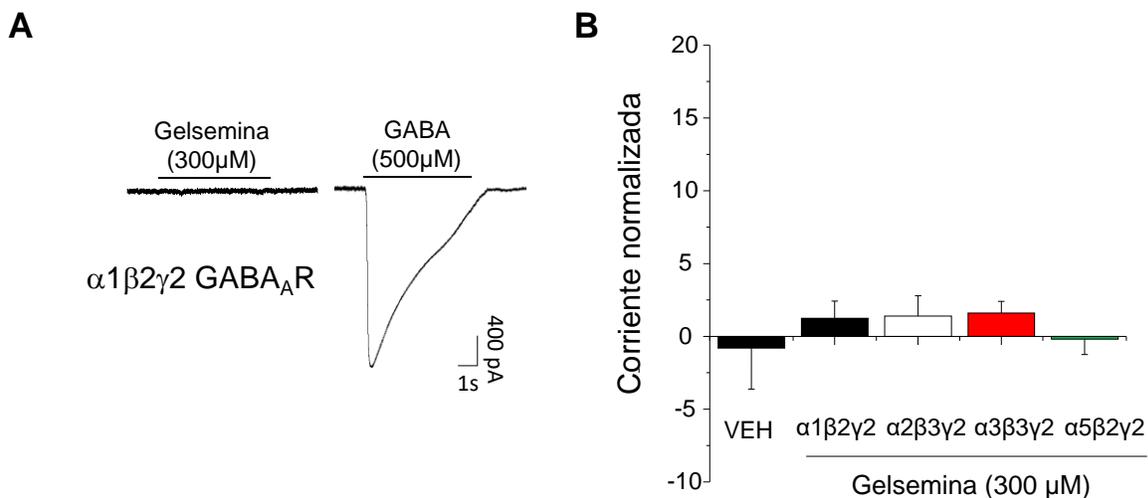


Figura 10. Ausencia de actividad agonista de gelsemina en GABA_ARs recombinantes sensibles a BDZ expresados en células HEK293. A. Trazos de corriente representativos que ilustran las acciones de gelsemina en ausencia de GABA en GABA_ARs de configuración α 1 β 2 γ 2. **B.** El gráfico resume el porcentaje de cambio en la línea de base de los registros. No se detectaron efectos agonistas inducidos por gelsemina. Los datos corresponden a promedios \pm SEM de 5 a 6 células.

Luego, en un segundo set de experimentos, se evaluó los efectos de gelsemina (0.01 – 300 μ M) sobre las corrientes activadas por concentraciones subsaturantes de GABA (EC_{10-15}) (Figura 10). La aplicación de concentraciones micromolares del alcaloide (>10 μ M) inhibieron significativamente las corrientes de cloruro evocadas por GABA de manera dependiente de la concentración (Figura 10 y Tabla 4). El análisis de las curvas de concentración-respuesta a gelsemina reveló un perfil de inhibición similar para los cinco subtipos de GABA_ARs estudiados (Figura 10). Ninguno de los subtipos de GABA_ARs estudiados fue completamente

bloqueado por el alcaloide (Figura 10 y Tabla 2). De acuerdo con estudios anteriores (Benson et al., 1998; Rudolph et al., 1999), la aplicación de 2 μM de diazepam fue capaz de potenciar la función de los GABA_ARs estudiados ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$; $146.1 \pm 35.9\%$ (n=6), $\alpha 2\beta 2\gamma 2$; $172.6 \pm 54.9\%$ (n=6), $\alpha 3\beta 3\gamma 2$; $242.1 \pm 32.8\%$ (n= 10) y $\alpha 5\beta 2\gamma 2$; 115.0 ± 35.6 (n=6)) (Figura 10C), esto confirma que en el modelo de estudio utilizado, neuronas corticales de 9-12 días, se encuentran expresados GABA_ARs nativos sensibles a BDZ.

En conjunto, estos resultados muestran que GABA_ARs sensibles a BDZ son modulados negativamente por gelsemina. La cuantificación de los efectos del alcaloide en GABA_ARs contrastan con los valores máximos de inhibición informados para GlyRs, en los cuales el porcentaje promedio de inhibición máxima fue de $\approx 87\%$, obtenido con la aplicación de 300 μM de gelsemina (Lara et al., 2016). Además, los valores de IC_{50} obtenidos en los subtipos de GABA_ARs fueron más altos y modulaciones máximas menores que los reportados anteriormente para GlyRs, los cuales mostraron IC_{50} de $\approx 40 \mu\text{M}$ y una modulación máxima de $\approx 87\%$, aplicando 300 μM (Lara et al., 2016). Estos resultados sugieren que gelsemina posee una menor eficiencia sobre los GABA_ARs en comparación con GlyRs (Sección Anexos, Tabla 1).

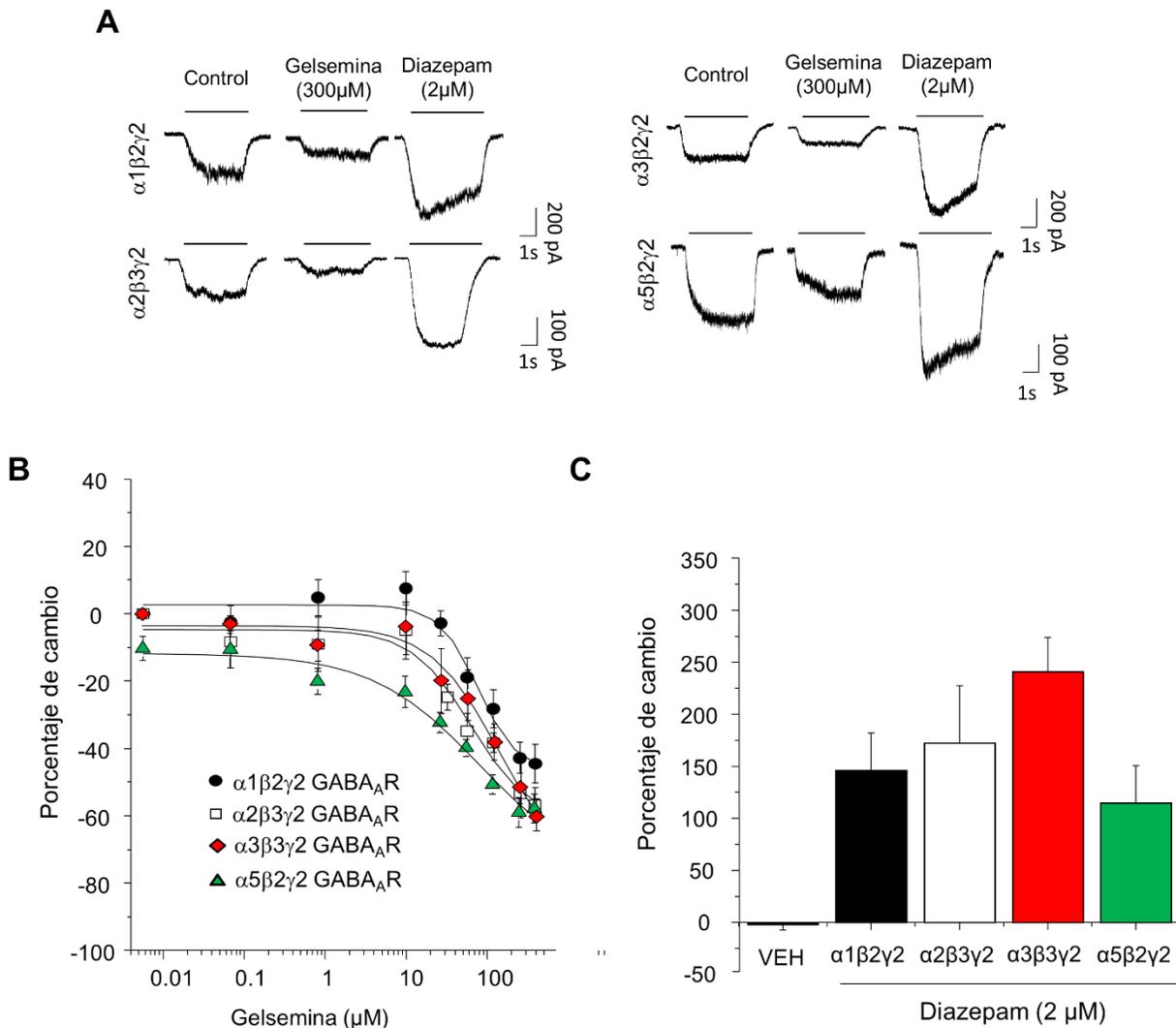


Figura 11. Modulación de GABA_ARs recombinantes sensibles a BDZ por gelsemina. **A.** Trazos representativos que muestran los efectos de gelsemina (300 μM) y los efectos potenciadores de diazepam (2 μM) en las corrientes evocadas por GABA en GABA_ARs de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2\gamma 2$. **B.** El gráfico resume los efectos de gelsemina (0.1–300 μM) en las corrientes evocadas por GABA de las células que expresaron GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2\gamma 2$. **C.** El gráfico resume los efectos de diazepam (2 μM) en las corrientes

evocadas por GABA de los receptores estudiados. No se obtuvieron diferencias significativas. Los datos corresponden a promedios \pm SEM de 5 a 10 células.

Tabla 4. Sensibilidad a gelsemina de GABA_ARs recombinantes sensibles a BDZ expresados en células HEK293.

GABA _A R	IC ₅₀ (μM)	n _H	Modulación máxima (%)	n
α1β2γ2	66.8±16.0	1.9±0.7	-44.3±9.9	6
α2β3γ2	55.2±13.7	1.2±0.5	-56.5±4.9	6
α3β3γ2	55.6±12.1	1.2±0.5	-63.5±5.0	10
α5β2γ2	72.1±7.9	0.7±0.3	-61.1±3.8	6

Para evaluar si la modulación inducida por gelsemina es conservada en GABA_AR nativos, se realizaron experimentos electrofisiológicos en cultivos de neuronas corticales de ratón (Figura 11-12). Al momento de nuestros experimentos electrofisiológicos (9-12 días en cultivo), esta preparación se compone de una población heterogénea de neuronas y células gliales. Antes de evaluar la sensibilidad a la gelsemina mediante experimentos electrofisiológicos, evaluamos la expresión de GABA_AR sensibles a BDZ mediante ensayos de RT-qPCR (Figura 12). Los resultados muestran que estos cultivos expresan el repertorio de subunidades necesario para configurar GABA_AR sensibles a BDZ, sugiriendo un predominio de receptores compuestos de subunidades α1 y α5, combinadas con β2 o β3 y γ2 (Figura 12).

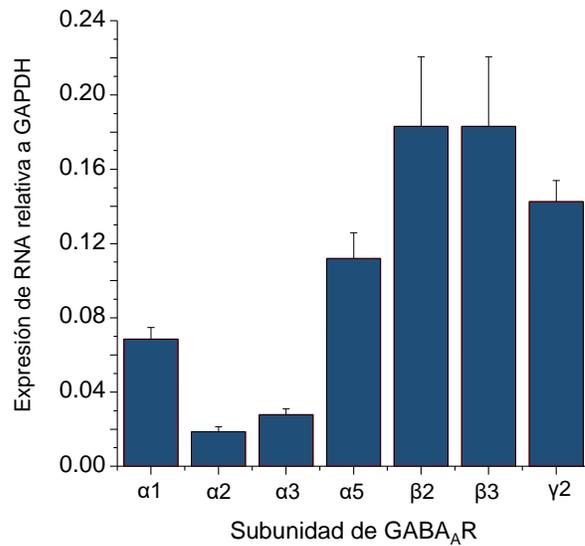


Figura 12. Análisis de RT-qPCR de subunidades de GABA_AR sensibles a BDZ en neuronas corticales de ratón en cultivo. El gráfico resume la expresión de las subunidades α1, α2, α3, α5, β2, β3, γ2 en relación con GAPDH en neuronas corticales ratón en cultivo. Los partidores para la enzima GAPDH se utilizaron como control (N=3).

Considerando esta información, luego se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de gelsemina (0.1 - 300 μM) sobre las corrientes evocadas por GABA utilizando una concentración sub-saturante de agonista (0.5 a 1 μM). Las corrientes de cloruro a través de los GABA_AR nativos fueron inhibidas por gelsemina de manera dependiente de la concentración (Figura 13B). Los valores de IC₅₀ y de inhibición máxima de la corriente inducida por gelsemina obtenidos de estas neuronas (IC₅₀ = 89.1 ± 16.4 μM y -49.6 ± 4.3 % con 300 μM, n=8) (Tabla 4) fueron similares a los resultados obtenidos desde receptores recombinantes (Figura 10 y Tabla 3). En concordancia con los datos obtenidos mediante RT-qPCR, las

corrientes evocadas por GABA obtenidas de estas neuronas fueron sensibles al diazepam ($64.6 \pm 10.9 \%$, $n = 7$, diazepam $2 \mu\text{M}$, Figura 13A).

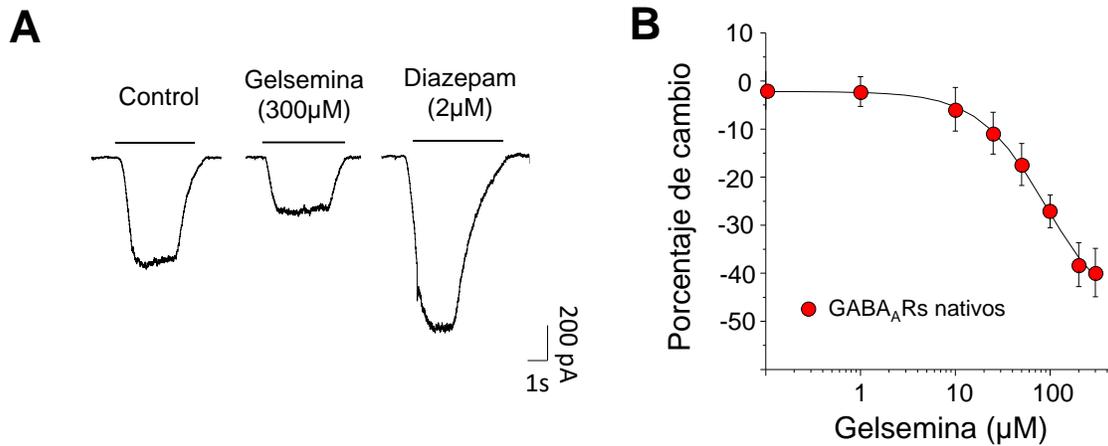


Figura 13. Modulación de GABA_AR nativos por gelsemina. **A.** Trazos de corriente representativos que ilustran los efectos negativos de gelsemina ($300 \mu\text{M}$) y los efectos positivos de diazepam ($2 \mu\text{M}$) sobre las corrientes evocadas por GABA expresados por neuronas corticales en cultivo. **B.** El gráfico resume los efectos de gelsemina ($0.1\text{-}300 \mu\text{M}$) en las corrientes evocadas por GABA. Los datos corresponden a promedios \pm SEM de 8 neuronas.

Para analizar los mecanismos involucrados en la inhibición de GABA_AR neuronales por gelsemina, determinamos la sensibilidad a GABA en presencia y en ausencia del alcaloide. El análisis de las curvas de concentración respuesta a GABA mostró que gelsemina ($200 \mu\text{M}$) disminuyó significativamente la afinidad aparente por GABA de los GABA_AR expresados en neuronas corticales (Figura 14A y Tabla 5). Por otro lado, el alcaloide no afectó significativamente la amplitud de la corriente

máxima evocada por concentraciones saturantes de GABA (Figura 14B y Tabla 5). Aunque estos datos sugieren que gelsemina modula los GABA_AR mediante la disminución de la afinidad aparente por GABA, el alcaloide aún podría alterar la desensibilización del canal iónico. Para evaluar esta posibilidad, se analizaron las propiedades cinéticas de las corrientes macroscópicas activadas por GABA a una concentración saturante de agonista (300 μ M) (Figura 14 C-D). Estos análisis mostraron que gelsemina no modificó la fracción de corriente desensibilizada o la constante de decaimiento de las corrientes evocadas por GABA (Figura 14 C-D y Tabla 5), lo cual permite concluir que gelsemina no tiene efectos sobre corrientes saturantes de los GABA_ARs corticales.

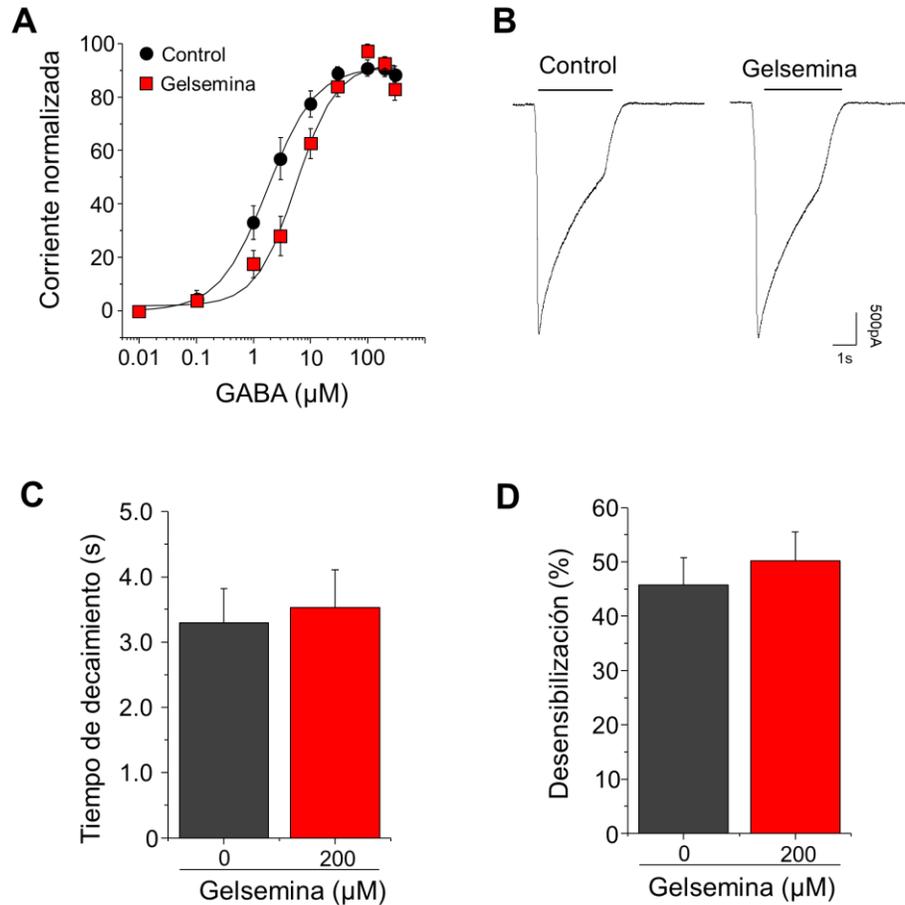


Figura 14. Efectos de gelsemina en la afinidad aparente por GABA y en la cinética de las corrientes macroscópicas de cultivos de neuronas corticales.

A. Curvas concentración respuesta a GABA en ausencia (círculos negros) y presencia (cuadrados rojos) de gelsemina (200 μM) realizadas en cultivos de neuronas corticales (n=12). **B.** Trazos de corriente representativas de GABA_{A} R nativos activados por una concentración saturante de GABA (300 μM) en ausencia y presencia de gelsemina (200 μM). **C-D.** Los gráficos resumen los efectos de gelsemina en el tiempo de decaimiento (C) y el porcentaje de corriente desensibilizada (D) de las corrientes evocadas por GABA. Las diferencias no fueron significativas (n=12, t-Student pareado)

Tabla 5. Sensibilidad a gelsemina de GABA_ARs nativos expresados en neuronas corticales de ratón en cultivo.

GABA _A R	Sensibilidad a GABA				Sensibilidad a gelsemina			
	EC ₅₀ (μM)	n _H	I _{max} (pA)	n	IC ₅₀ (μM)	n _H	Modulación máxima (%)	n
Nativos	2.1±0.5	1.0±0.1	2492±568	12	89.1±16.4	1.2±0.1	-49.6±4.3	8
+ Gels.	7.4±1.0*	1.2±0.2	1995±434	12	-	-	-	-

Los resultados se presentan como promedios ± SEM. *, P<0.01, t-Student no pareado, receptores nativos en ausencia y presencia de gelsemina (+ Gels., 200 μM).

En resumen, los resultados descritos anteriormente demuestran que el alcaloide gelsemina es capaz de inhibir la función de GABA_ARs expresados en células HEK293 y de receptores nativos expresados en neuronas corticales en cultivo. Estos datos sugieren que la modulación inducida por el alcaloide es efectiva en GABA_ARs expresados en el SNC de mamíferos, lo que podría estar relacionado a los efectos benéficos y tóxicos de la gelsemina.

4.2. Modulación de GABA_ARs recombinantes por Gelsevirina, Koumina y Humantenmina.

La modulación de los GABA_ARs recombinantes y neuronales por gelsemina sugiere que otros alcaloides de *Gelsemium* pudieran poseer efectos inhibitorios similares. Sin embargo, existe la posibilidad que otros compuestos muestren diferencias en la eficacia y en la potencia de la modulación de GABA_ARs, lo que es interesante desde un punto de vista farmacológico. Considerando la abundancia de los diferentes alcaloides del *Gelsemium*, se realizaron estos estudios con: i. koumina, el alcaloide prototípico del tipo koumina; ii, humantenmina, también llamado gelsenicina, el alcaloide prototípico del tipo gelsedina; y gelsevirina, perteneciente al grupo de alcaloides del tipo gelsemina.

Debido a que los 5 subtipos de GABA_ARs estudiados mostraron una modulación similar por gelsemina (Figura 10 y Tabla 4), este grupo de ensayos se centró en la modulación de GABA_ARs de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, la que corresponde al subtipo más expresado en el cerebro de mamíferos. De modo similar a gelsemina, la aplicación de koumina y de gelsevirina (50 μ M) inhibió la corriente activada por GABA (Figura 15). Por el contrario, el alcaloide humantenmina (50 μ M) no logró modificar significativamente la amplitud de la corriente GABAérgica (Figura 15). Aplicaciones de 100 y 300 μ M de humantenmina tampoco fueron capaces de modular la corriente evocada por GABA (Figura 15C).

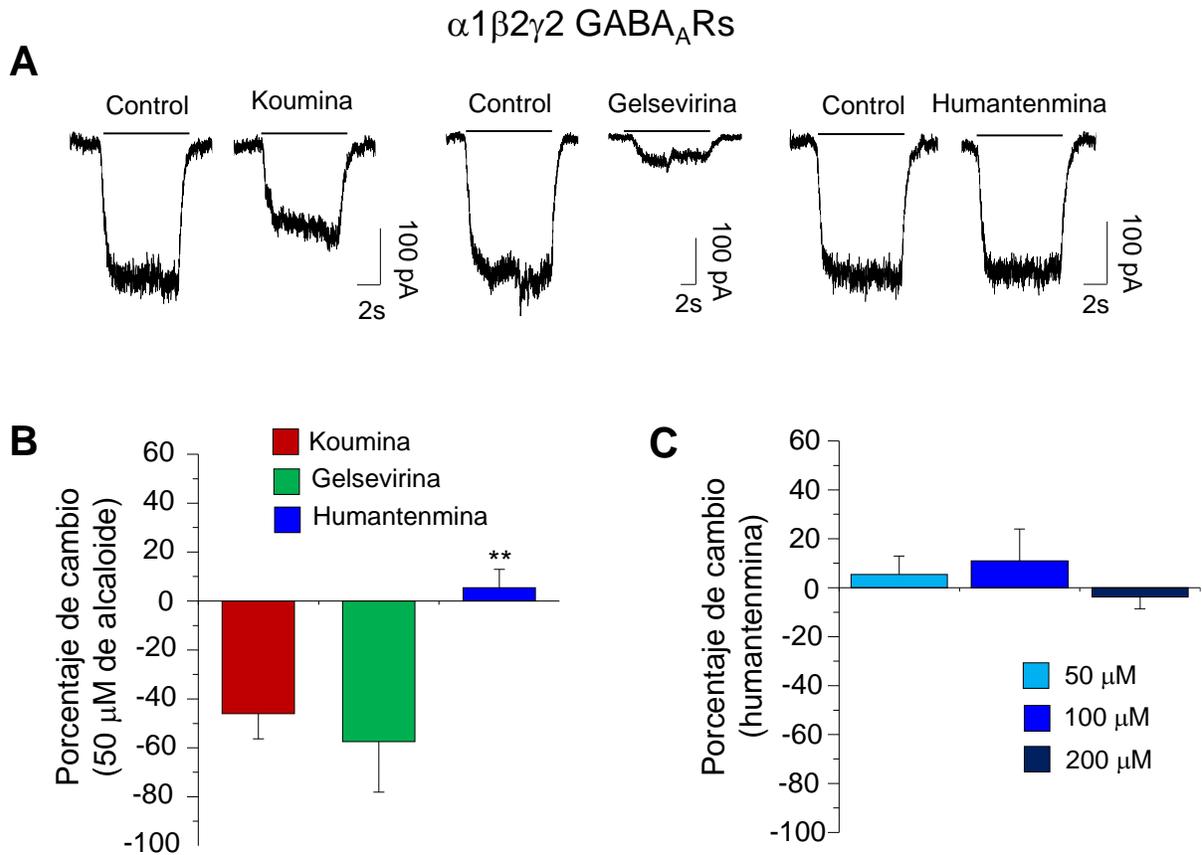


Figura 15. Efectos de koumina, gelsevirina y humantenmina en GABA_ARs de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. **A.** Trazos de corriente representativos para los efectos de koumina (50 μ M), gelsevirina (50 μ M) y humantenmina (300 μ M) en las corrientes evocadas por GABA. **B.** El gráfico de barras resume los efectos de los tres alcaloides del *Gelsemium*, a una concentración de 50 μ M, en las corrientes evocadas por GABA. El porcentaje de cambio fue significativamente diferente para humantenmina con respecto a koumina y gelsevirina (**, $P < 0.001$, ANOVA). Los porcentajes de cambio inducidos por koumina y gelsevirina no fueron diferentes. **C.** El gráfico resume el efecto de humantenmina (50, 100 y 200 μ M) en las corrientes evocadas por GABA. Los datos corresponden a promedios \pm SEM de 4 a 9 células.

En conjunto, estos resultados muestran que GABA_ARs sensibles a BDZ son modulados negativamente por gelsemina, koumina y gelsevirina. Por el contrario, el alcaloide humantenmina no modificó la corriente GABAérgica a ninguna concentración testada. Estos resultados sugieren que los alcaloides del tipo gelsemina y del tipo koumina poseen una actividad inhibitoria detectable sobre GABA_ARs, mientras que los alcaloides del tipo gelsedina no ejercerían acciones funcionales en estos tipos de receptores.

4.3. Modulación de GlyRs recombinantes por Gelsevirina, Koumina y Humantenmina.

Estudios anteriores demostraron que gelsemina modula la función de GlyR recombinantes y nativos (Lara et al., 2016). De modo interesante, estos estudios demostraron que el alcaloide mostró efectos funcionales dependientes de la composición del GlyR. Por una parte, gelsemina potenció la función de GlyRs compuestos solo de subunidades $\alpha 1$ a concentraciones entre 0.5 y 50 μ M, mientras que concentraciones sobre 50 μ M inhibieron las corrientes de GlyRs homoméricos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, y heteropentaméricos $\alpha 1\beta$, $\alpha 2\beta$ y $\alpha 3\beta$, sin mostrar potenciación de la función (Lara et al., 2016). A la fecha, no se ha descrito si otros alcaloides del *Gelsemium* son capaces de modular la función de GlyRs. Para resolver esta pregunta, se exploró los efectos de koumina, gelsevirina y humantenmina en todas las configuraciones de GlyRs (i.e. receptores homoméricos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ junto con heteropentaméricos $\alpha 1\beta$, $\alpha 2\beta$ y $\alpha 3\beta$) a través de *patch-clamp* en modalidad célula completa en células HEK 293 (Tabla 6 y Figura 16-18).

En una primera etapa, se analizaron los efectos de koumina (0.01 – 300 μM) sobre las corrientes activadas por glicina (EC_{10}) de GlyRs recombinantes. En estos experimentos, utilizamos los parámetros farmacológicos de GlyRs anteriormente publicados por nuestro grupo (Lara et al., 2016). La aplicación de concentraciones menores a 10 μM de koumina no modificó la corriente activada por glicina en ninguna configuración de los GlyRs. Por el contrario, concentraciones mayores a 25 μM inhibieron significativamente las corrientes de GlyRs homoméricos y heteropentaméricos (Figura 16B). El análisis de las curvas concentración respuesta a koumina reveló algunas diferencias estadísticas significativas entre configuraciones del GlyR (Figura 16 y Tabla 6). Por ejemplo, el IC_{50} de koumina para receptores homoméricos $\alpha 1$ fue de $31.5 \pm 1.8 \mu\text{M}$ (n=6), mientras que para homoméricos $\alpha 2$ fue de $11.2 \pm 2.1 \mu\text{M}$ (n=6) (t-Student no pareado, $p < 0.001$). Por otra parte, todas las configuraciones del GlyR examinadas fueron inhibidas en más de un 85-90% por koumina, sin mostrar diferencias significativas en los porcentajes de inhibición máxima (Figura 16 y Tabla 6).

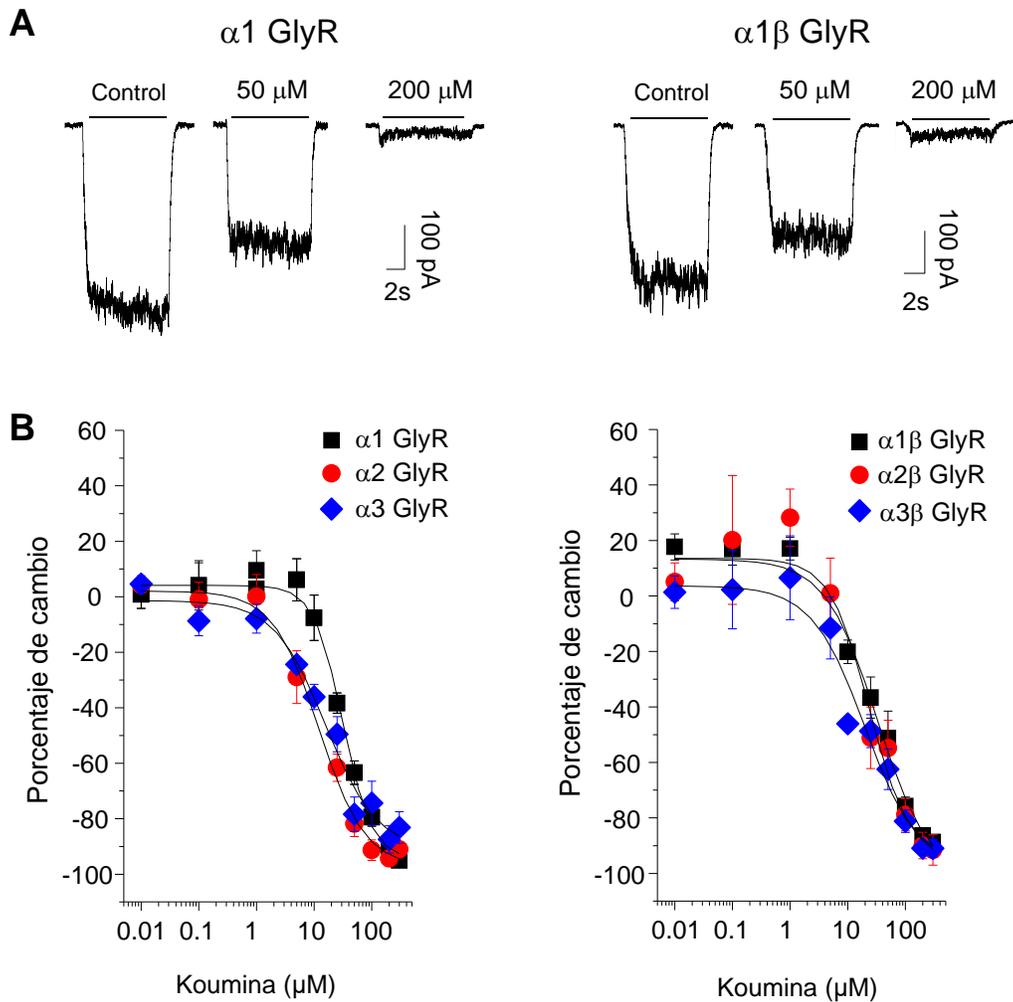


Figura 16. Acciones de koumina sobre GlyRs recombinantes expresados en células HEK293. A. Trazos de corriente representativos que muestran las acciones inhibitorias del alcaloide koumina sobre las corrientes evocadas por glicina. **B.** El gráfico resume los efectos de koumina (0.1-300 μM) en las corrientes evocadas por glicina de GlyR homo y heteropentaméricos. Los datos corresponden a promedios \pm SEM de 4-6 células.

La caracterización de los alcaloides de *Gelsemium* en GlyRs continuó con gelsevirina, molécula perteneciente al grupo de alcaloides del tipo gelsemina (Figura 17). Los resultados electrofisiológicos mostraron que gelsevirina mostro un perfil farmacológico similar a koumina, inhibiendo la actividad de todas las configuraciones de GlyR examinados (Figura 17B y Tabla 6). El análisis de las curvas concentración respuesta a gelsevirina de diferentes configuraciones del GlyR mostró, en algunos casos, diferencias significativas (Figura 17 y Tabla 6). Por ejemplo, el IC₅₀ de gelsevirina para receptores homoméricos α3 fue de 4.0±0.7 μM (n=9), mientras que para homoméricos α2 fue de 40.1±5.5 μM (n=4) (t-Student no pareado, p<0.01). Similar a lo observado con koumina, todas las configuraciones del GlyR fueron inhibidas en más de un ≈80% por gelsevirina, sin mostrar diferencias significativas en los porcentajes de inhibición máxima (Figura 17 y Tabla 6).

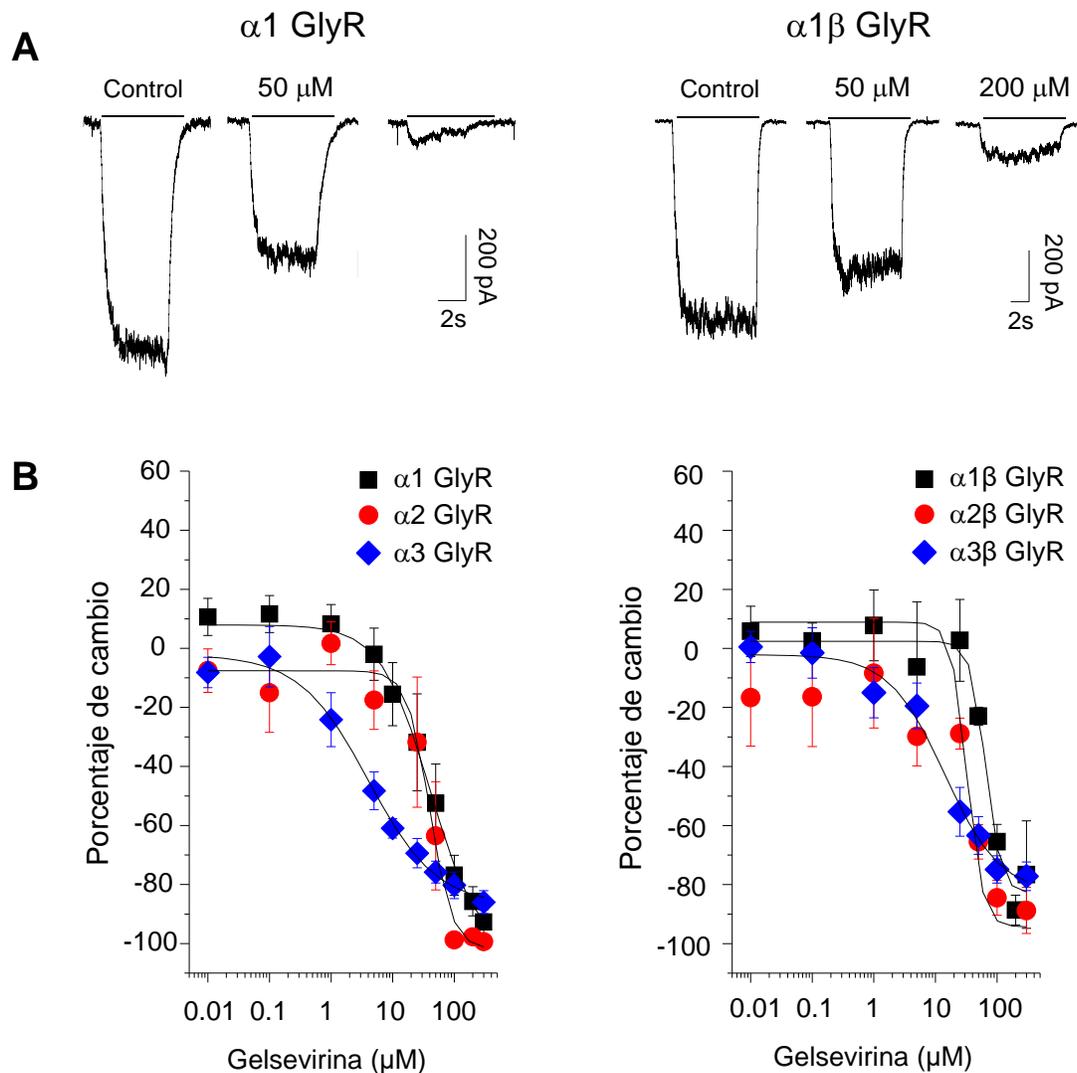


Figura 17. Efectos de gelsevirina sobre GlyRs recombinantes expresados en células HEK293. A. Trazos de corriente representativos que muestran las acciones inhibitorias del alcaloide gelsevirina sobre las corrientes evocadas por glicina. **B.** El gráfico resume los efectos de gelsevirina (0.1-300 μM) en las corrientes evocadas por glicina de GlyR homo y heteropentaméricos. Los datos corresponden a promedios \pm SEM de 4-9 células.

Finalmente, las acciones del alcaloide humantenmina en GlyRs fueron analizadas a través de experimentos similares (Figura 18). De modo análogo a los hallazgos encontrados en GABA_ARs (Figura 14), los datos electrofisiológicos mostraron que la aplicación de un amplio rango de concentraciones de humantenmina (0.01-300 μ M) no modificó significativamente la amplitud de todas las configuraciones de GlyR examinadas (Figura 18 y Tabla 6). Estos resultados contrastan con los datos obtenidos con koumina y gelsevirina, los cuales mostraron que la aplicación de 200-300 μ M generó una robusta y significativa inhibición de las corrientes glicinérgicas, mostrando un porcentaje de inhibición máxima de \approx 85%, mientras que humantenmina, en condiciones similares, no tuvo acciones significativas, mostrando un porcentaje de inhibición máxima de \approx 3% (Figura 18 y Tabla 6).

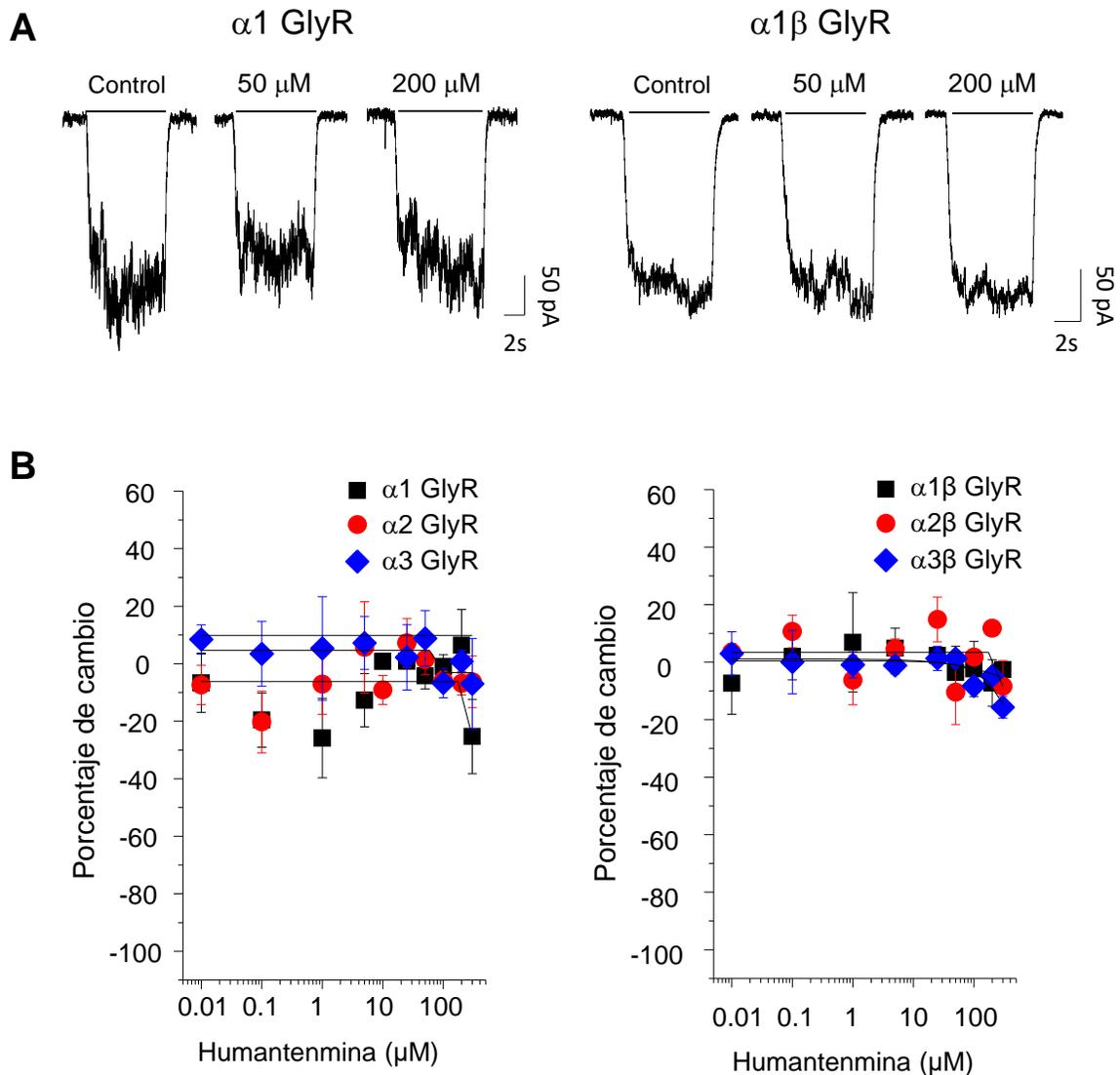


Figura 18. El alcaloide humanenmina no modificó significativamente las corrientes activadas por glicina de GlyRs recombinantes. A. Trazos de corriente representativos que muestran los efectos del alcaloide humanenmina sobre las corrientes evocadas por glicina. **B.** El gráfico resume los efectos de humanenmina (0.1-300 μM) en las corrientes evocadas por glicina de GlyR homo y heteropentaméricos. Los cambios no fueron significativos. Los datos corresponden a promedios \pm SEM de 3-6 células.

Tabla 6. Sensibilidad a koumina, gelsevirina y humantenmina de GlyR recombinantes expresados en células HEK293.

GlyR	Alcaloide	IC ₅₀ (μM)	K _D (μM)	n _H	M. Max (%)	Concentración M. Max (μM)	n
α1	KM	31.5±1.7	53.1±17.1	1.7±0.1	-95.0±1.5	300	6
	GV	40.6±8.2	50.1±9.5	1.1±0.1	-92.7±4.1	300	9
	HM	ND	ND	ND	-25.8±13.7	1	6
α2	KM	11.2±2.1	44.2±4.6	1.0±0.2	-94.3±2.7	200	6
	GV	40.1±5.5	73.9±21.7	2.4±0.7	-99.1±0.3	300	4
	HM	ND	ND	ND	8.7±9.6	50	6
α3	KM	15.8±4.6	33.9±15.8	0.9±0.2	-87.4±4.9	200	8
	GV	4.0±0.7	8.7±5.4	0.7±0.1	-85.9±3.8	300	9
	HM	ND	ND	ND	-20.2±10.7	0.1	4
α1β	KM	32.5±13.2	50.1±9.5	0.9±0.5	-90.8±2.3	300	4
	GV	65.2±6.5	88.5±13.6	3.5±0.9	-88.6±5.0	200	4
	HM	ND	ND	ND	-7.3±10.8	0.01	5
α2β	KM	23.6±8.3	57.4±4.0	1.3±0.6	-91.5±5.4	300	4
	GV	38.9±7.7	25.2±15.0	3.0±1.5	-88.7±7.8	300	4
	HM	ND	ND	ND	-10.3±11.2	50	4
α3β	KM	20.2±7.7	54.1±20.0	0.9±0.2	-90.9±3.15	300	7
	GV	14.0±4.3	30.1±19.5	0.9±0.2	-77.1±4.8	300	9
	HM	ND	ND	ND	-15.6±3.8	300	3

KM, koumina; GV, gelsevirina, HM, humantenmina; M. Max., modulación máxima; Concentración M. Max., concentración de la modulación máxima; ND, no determinado; K_D, constante de disociación en base a ecuación de Cheng-Prusoff.

En conjunto, estos resultados muestran que los GlyRs son modulados negativamente por koumina y gelsevirina. Por el contrario, el alcaloide humantenmina no fue capaz de modificar las corrientes glicinérgicas a ninguna concentración testada. Estos resultados sugieren que los alcaloides del tipo gelsemina y del tipo koumina poseen una actividad inhibitoria robusta sobre GlyR compuestos por diferentes subunidades, mientras que los alcaloides del tipo

gelsemina no ejercerían acciones funcionales en GlyRs. Por otra parte, estos resultados sugieren que las acciones potenciadoras de gelsemina en GlyR compuestos de la subunidad $\alpha 1$ son exclusivos para este alcaloide y no necesariamente son conservados en el grupo de alcaloides de *Gelsemium* del tipo gelsemina.

4.4. Sitios de unión putativos para los alcaloides de *Gelsemium* en GABA_ARs y en GlyRs.

Los resultados electrofisiológicos anteriormente descritos confirman que gelsemina, koumina y gelsevirina son moduladores funcionales negativos de GABA_ARs y de GlyRs. En líneas generales, estos resultados mostraron además que los GlyRs son más sensibles a la inhibición por estos alcaloides que los GABA_ARs. Por otra parte, los datos mostraron que humantenmina, un alcaloide del tipo gelsemina, no logró modular ningún subtipo de receptor inhibitorio, sugiriendo un margen de especificidad importante dentro de los alcaloides del *Gelsemium* en relación con la modulación funcional de GABA_ARs y de GlyRs.

La inhibición de la función de estos receptores por gelsemina, koumina y gelsevirina sugiere la presencia de sitios de unión conservados en ambas clases de receptores. En este sentido, estudios de otros grupos de investigación han mostrado, a través de experimentos de desplazamiento de ³H-estricnina realizados en tejido de médula espinal, que gelsemina es capaz de unirse a GlyRs espinales (Zhang et al., 2013). A su vez, estudios de nuestro grupo mostraron que gelsemina disminuyó la afinidad aparente de GlyRs recombinantes, desplazando significativamente el EC₅₀ a glicina a la derecha (Lara et al., 2016). Lo anterior

sugiere que gelsemina se une al sitio ortostérico del GlyR, por lo que compartiría el mismo sitio de unión del agonista glicina y del antagonista clásico del GlyR, estriknina.

Considerando estas evidencias, resulta lógico pensar que otros alcaloides del *Gelsemium* se unirían competitivamente a los sitios de unión de GABA y de glicina en sus respectivos receptores. Sin embargo, los efectos potenciadores de gelsemina en GlyR compuestos de la subunidad $\alpha 1$ sugieren que podrían existir sitios adicionales de modulación, diferentes al sitio ortostérico. Por otra parte, a la fecha no existen resultados experimentales que hayan confirmado la unión de gelsemina u otro alcaloide de *Gelsemium* a los GlyRs mediante estudios estructurales asociados a mutagénesis de residuos específicos. Finalmente, actualmente no ha sido estudiado si estos alcaloides se unirían también al sitio ortostérico de GABA_ARs. En base a estas interrogantes, se desarrollaron experimentos y aproximaciones para explorar los sitios de unión putativos de los alcaloides de *Gelsemium* en GABA_ARs y de GlyRs, poniendo un foco especial en la determinación de los efectos diferenciales de gelsemina en GlyRs compuestos de la subunidad $\alpha 1$. Para una mayor comprensión de estos ensayos, se mostrarán resultados relacionados a GABA_ARs y GlyRs de manera independiente y secuencial.

4.4.1. Sitios de unión putativos para gelsemina en GABA_ARs.

Los sitios de unión putativos relacionados a la inhibición funcional de GABA_ARs sensibles a BDZ por gelsemina no han sido investigados. Las acciones ansiolíticas de gelsemina en ensayos de comportamiento sugieren la posibilidad de que el alcaloide ejerza efectos directos sobre el sitio de unión a las BDZ. Sin embargo, la modulación negativa de las corrientes GABAérgicas de gelsemina (Figura 10 y Tabla 4) sugiere que su mecanismo de acción es distinto al de las BDZ clásicas, las cuales potencian la función GABAérgica. A pesar de este racional, el alcaloide aún podría ejercer sus acciones sobre GABA_ARs mediante agonismo inverso en el sitio de las BDZ o a través de sitios moleculares no relacionados con las subunidades $\gamma 2$ (Ghit et al., 2021; Kim & Hibbs, 2021; Olsen et al., 2019). Para responder estas interrogantes, evaluamos los efectos de gelsemina sobre GABA_AR compuestos por subunidades $\alpha 1(H101R)\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 1\beta 2$ (Figura 19 y Tabla 7). La subunidad $\alpha 1(H101R)$ de GABA_AR contiene una mutación puntual de histidina a arginina en la posición 101, lo que altera el sitio de unión de BDZ, generando GABA_ARs insensibles al diazepam, pero normalmente sensibles al agonista GABA (Benson et al., 1998; Knoflach & Bertrand, 2021; Ralvenius et al., 2015). En estos experimentos, seleccionamos el subtipo $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ para evaluar la relevancia del sitio de unión de BDZ debido a que es el subtipo de GABA_AR más expresado en el cerebro de mamíferos (Fritschy, 2015). Por otro lado, los receptores $\alpha 1\beta 2$ no son sensibles a las BDZ debido a la ausencia de la interfase $\alpha 1-\gamma 2$, pero conservan la sensibilidad a su agonista, GABA, y a otros moduladores del receptor, tales como propofol, neuroesteroides y etomidato (Kim & Hibbs, 2021; Knoflach & Bertrand,

2021; Olsen et al., 2019). Los experimentos realizados demostraron que los GABA_AR de configuración $\alpha 1(\text{H101R})\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 1\beta 2$ fueron insensibles a la aplicación de 2 μM de diazepam ($-2.0 \pm 4.7\%$ y $4.0 \pm 2.9\%$, respectivamente), en comparación con receptores *wild-type* de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ($146.1 \pm 35.9\%$) (Figura 19A-B). Por el contrario, la aplicación de 300 μM de gelsemina provocó una inhibición similar de las corrientes evocadas por GABA en estos receptores ($\alpha 1(\text{H101R})\beta 2\gamma 2$: $-50.8 \pm 11.8\%$, $\alpha 1\beta 2$: $-44.1 \pm 2.5\%$ y $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ de tipo salvaje: $-40.1 \pm 5.4\%$) (Figura 19C). En resumen, estos estudios permiten concluir que el sitio de unión a las BDZ ni la presencia de la subunidad $\gamma 2$ son necesarios para los efectos inhibitorios de gelsemina en GABA_ARs.

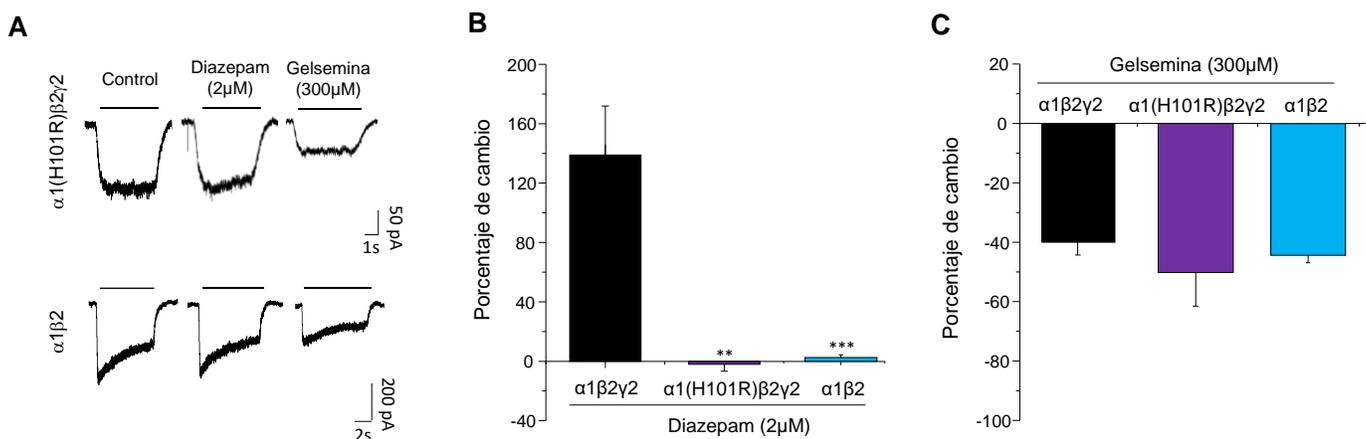


Figura 19. Relevancia del sitio de unión a las BDZ y de la subunidad $\gamma 2$ en las acciones de gelsemina en GABA_ARs. A. Trazos de corriente representativos de los efectos de diazepam (2 μM) y de gelsemina (300 μM) en las corrientes evocadas por GABA a través de $\alpha 1(\text{H101R})\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 1\beta 2$ GABA_AR. **B-C.** Los gráficos resumen las acciones de diazepam (B) y gelsemina (C) sobre GABA_AR $\alpha 1(\text{H101R})\beta 2\gamma 2$ y

$\alpha 1\beta 2$. Para el panel B, las diferencias fueron significativas ($***P < 0.001$, $**P < 0.01$, ANOVA con test post-hoc de Bonferroni, $F(2,14) = 3.860$). Para el panel C, las diferencias no fueron significativas.

Tabla 7. Propiedades farmacológicas de GABA_ARs recombinantes de configuración $\alpha 1(H101R)\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 1\beta 2$

GABA _A R	EC ₅₀ (μM)	n _H	I _{max} (pA)	n
$\alpha 1(H101R)\beta 2\gamma 2$	2.3±0.1	1.5±0.2	1946±266	5
$\alpha 1\beta 2$	2.1±0.1	1.6±0.2	1641±271	6

Estos resultados demuestran que los efectos de la gelsemina sobre la función de GABA_AR requieren solo de las subunidades α y β , proponiendo una posible unión del alcaloide al sitio ortostérico. Sin embargo, los GABA_AR compuestos por subunidades α y β poseen sitios moduladores para otros ligandos (por ejemplo, propofol y neuroesteroides) (Olsen et al., 2019, Kim & Hibbs, 2021) y, por lo tanto, estos datos aun no descartan que las acciones de la gelsemina ocurran exclusivamente a través de interacciones con el sitio ortostérico. Para contribuir a resolver estas interrogantes, se desarrollaron estudios bioinformáticos en colaboración con el Prof. Carlos F. Burgos (Departamento de Fisiología, Universidad de Concepción), los que permitieron profundizar en estos aspectos desde un punto de vista estructural. Los resultados obtenidos (Sección Anexos, Figura 1) muestran que los alcaloides del *Gelsemium* se unen preferentemente a la región extracelular (ECD) de GABA_ARs de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Los alcaloides se unen en sitios cercanos al sitio ortostérico y en el sitio ortostérico, el cual se encuentra en la interfase entre subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$. Ensayos complementarios de “*docking*” molecular mostraron que gelsemina, koumina y gelsevirina lograron unirse al sitio

ortostérico con propiedades energéticas favorables. Humantenmina, pese a no modular funcionalmente a los GABA_ARs, también logró unirse al sitio ortostérico. Ensayos similares mostraron que la interfase entre subunidades $\alpha 1$ y $\gamma 2$, la cual contiene el sitio de unión de las BDZ, no logró unir ninguno de los alcaloides de manera detectable, lo que reafirma la idea de que los alcaloides de *Gelsemium* no requieren de la subunidad $\gamma 2$ para ejercer sus efectos inhibitorios sobre GABA_ARs.

4.4.2. Sitios de unión putativos para alcaloides del *Gelsemium* en GlyRs.

Para analizar los potenciales sitios de unión de los alcaloides de *Gelsemium* al GlyR, comenzamos investigando los requerimientos moleculares de la modulación bifásica de gelsemina en GlyRs compuestos de la subunidad $\alpha 1$ (Lara et al., 2016). Una posibilidad para explicar este tipo de modulación sugiere que el alcaloide pudiera unirse a sitios diversos dentro de la estructura del receptor, lo que pudiera incluir el sitio ortostérico. Con el objetivo de verificar esta idea, se desarrollaron estudios bioinformáticos en colaboración con el Prof. Carlos F. Burgos (Departamento de Fisiología, Universidad de Concepción), los que permitieron analizar los posibles sitios de unión de gelsemina en la estructura del $\alpha 1$ GlyRs homomérico (Sección Anexos, Figura 2). Este análisis mostró que gelsemina se uniría mayoritariamente a sitios localizados en el ECD del receptor ($\approx 75\%$ de los complejos), lo que sugiere que el alcaloide se uniría al sitio ortostérico. Sin embargo, cerca de un $\approx 25\%$ de los complejos gelsemina-receptor se posicionaron en los dominios de transmembrana (TMs), sugiriendo múltiples sitios de unión. De modo interesante, gelsevirina también mostró formación de complejos alcaloide-receptor en los TMD. Contrariamente, koumina y humantenmina solo mostraron formación

de complejos en el ECD del receptor, algunos asociados al sitio ortostérico (Sección Anexos, Figura 2).

Para examinar funcionalmente la relevancia del ECD y de los TMD para las acciones específicas de subunidades de la gelsemina en los α 1GlyR, estudiamos receptores quiméricos en los que los ECD de las subunidades α 1 y α 2 fueron intercambiados (Yevenes et al., 2010) (Figura 20). La relevancia funcional del ECD se evaluó testeando la potenciación y la inhibición provocada por gelsemina en estos receptores. De acuerdo con experimentos reportados por nuestro grupo (Lara et al., 2016), los experimentos en α 1GlyR *wild-type* demostraron que la aplicación de 10 μ M de gelsemina potenció las corrientes glicinérgicas (44.8 ± 13.5 %; $n=9$). A su vez, la aplicación de 50 μ M de gelsemina inhibió las corrientes glicinérgicas en α 2GlyR *wild-type* (-47.8 ± 2.8 ; $n=6$). El intercambio del ECD α 1 con su homólogo α 2 (i.e., receptor quimérico α 2- α 1) fue suficiente para cambiar la potenciación a inhibición (50 μ M de gelsemina, -48.6 ± 7.4 , $n=10$). Del mismo modo, el intercambio del ECD α 2 con su contraparte α 1 fue suficiente para cambiar la modulación negativa de α 2GlyR *wild-type* a potenciación (receptor quimérico α 1- α 2, 10 μ M de gelsemina, 42.1 ± 22.9 , $n=7$). En conjunto, estos resultados sugieren que la modulación bifásica de α 1GlyRs se relaciona exclusivamente con elementos del ECD, descartando la participación de otros potenciales sitios de unión del alcaloide en otros dominios del canal iónico.

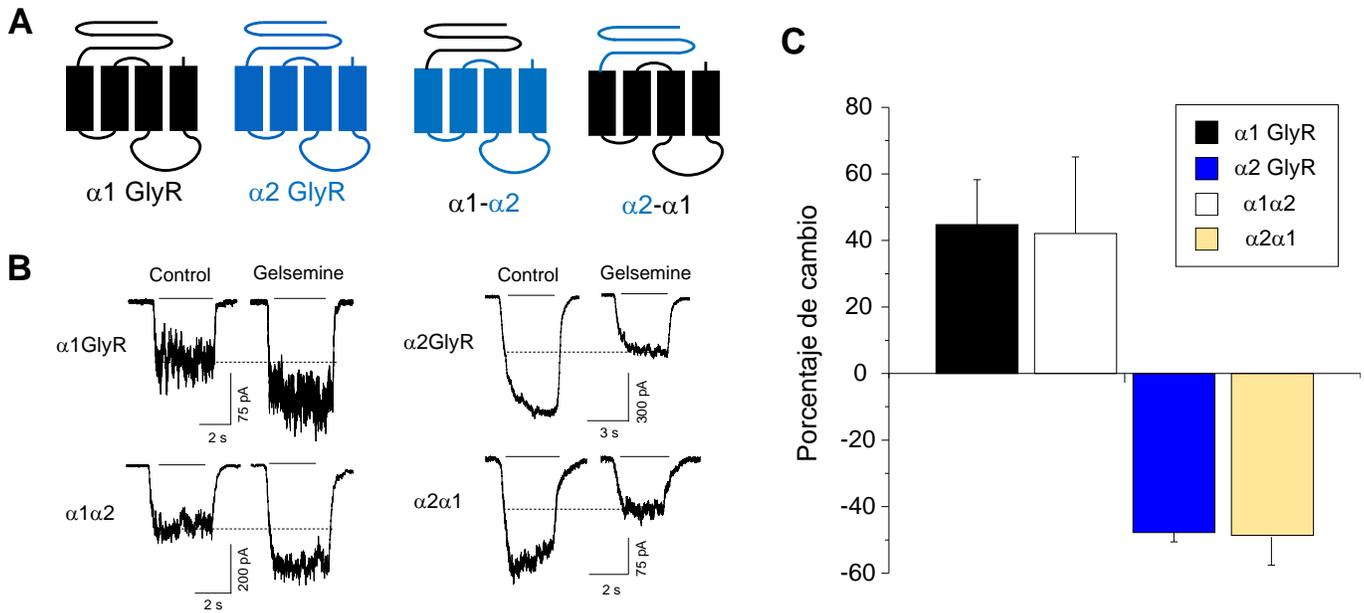


Figura 20. Acciones de gelsemina en GlyR quiméricos. **A.** Vista esquemática de las construcciones GlyR quiméricas y *wild-type* utilizadas. Las construcciones han sido previamente caracterizadas (Yévenes et al., 2010). **B.** Trazos de corriente evocadas por glicina en ausencia y presencia de gelsemina obtenidas desde células HEK293 que expresaron GlyR quiméricos y *wild-type*. La potenciación de $\alpha 1$ GlyR por gelsemina se investigó con una concentración de 10 μM de gelsemina, mientras que la inhibición fue explorada con una concentración de 50 μM . **C.** El gráfico resume las acciones de gelsemina sobre la potenciación de la corriente provocada por la glicina (10 μM) o la inhibición (50 μM). Los datos se muestran como promedio \pm SEM de 7-9 células por grupo. Las diferencias entre $\alpha 1$ GlyR *wild-type* y $\alpha 1-\alpha 2$, y entre $\alpha 2$ GlyR *wild-type* y $\alpha 2-\alpha 1$ no fueron significativas.

Nuestros datos funcionales y la evidencia proveniente de otros grupos sugieren fuertemente que el sitio ortostérico es posiblemente el sitio molecular crítico responsable de los efectos positivos y negativos de los alcaloides del *Gelsemium* en GlyRs. Para examinar directamente esta idea, en una primera etapa se realizó una inspección *in silico* de las interacciones moleculares de gelsemina, koumina, gelsevirina y humantenmina con el sitio ortostérico de GlyR compuestos de $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, en colaboración con el Prof. Carlos F. Burgos (Departamento de Fisiología, Universidad de Concepción) (Sección Anexos, Figura 3 y 4). Estos datos mostraron que todos los alcaloides, incluido humantenmina, poseen valores de “*docking score*” que sugieren interacciones con el sitio ortostérico (Sección Anexos, Figura 3). Para continuar este estudio, en la segunda etapa se examinaron los residuos críticos que estabilizan la interacción entre los alcaloides y el sitio ortostérico. Sin embargo, debido al efecto bifásico de la gelsemina en $\alpha 1$ GlyRs y a su relevancia fisiológica, se decidió centrar estos análisis en este subtipo de GlyR. El análisis de las interacciones moleculares indicó que los residuos F63, S129, F159, G160 y F207 son críticos para mantener una interacción estable entre gelsemina y el sitio ortostérico de $\alpha 1$ GlyRs (Sección Anexos, Figura 4). La interacción putativa entre koumina y gelsevirina también mostró ser dependiente de aminoácidos similares. En el contexto de estos resultados, cabe destacar que la humantenmina, aunque se muestra unida al sitio ortostérico, no mostró interacciones detectables con los residuos clave que estabilizaron la unión de gelsemina, koumina y gelsevirina.

Para corroborar experimentalmente estos hallazgos *in silico*, se planificó realizar registros electrofisiológicos en α 1GlyR que contienen mutaciones en los aminoácidos clave del sitio ortostérico. Sin embargo, es necesario considerar que mutaciones en el sitio ortostérico pudieran generar receptores no funcionales, al alterar el sitio de unión del agonista glicina. Para evitar esta potencial dificultad, se analizó el impacto en la unión de glicina de un set de mutaciones en el sitio ortostérico a través de cálculos de “*docking score*”. Para corroborar experimentalmente estos hallazgos *in silico*, se planificó realizar registros electrofisiológicos en α 1GlyR que contienen mutaciones en los aminoácidos clave del sitio ortostérico. Sin embargo, es necesario considerar que mutaciones en el sitio ortostérico pudieran generar receptores no funcionales, al alterar el sitio de unión del agonista glicina. Para evitar esta potencial dificultad, se analizó el impacto en la unión de glicina de un set de mutaciones en el sitio ortostérico usando aproximaciones bioinformáticas. Estos ensayos mostraron que las sustituciones F63A, G160E y F207A generaron algunas variaciones en la unión de los alcaloides al sitio, pero conservando una proporción importante de la unión de glicina. En consecuencia, dos de estas mutaciones fueron estudiadas mediante electrofisiología (Figura 21). De acuerdo con lo obtenido en ensayos *in silico*, la introducción de las mutaciones F63A y G160E originó receptores capaces de generar corrientes activadas por glicina (Figura 21A). Nuestros estudios electrofisiológicos indicaron que los GlyR mutantes fueron insensibles a concentraciones de gelsemina que generan potenciación (10 μ M) o inhibición (200 μ M) de las corrientes activadas por glicina en α 1GlyR *wild-type*. Registros

adicionales mostraron que la aplicación de 200 μM de koumina y gelsevirina no ejercieron efectos detectables sobre las corrientes glicinérgicas asociados a estos GlyR mutados (Figura 21). Por otra parte, estudios complementarios mostraron que la mutante F63A no fue inhibida por estriquina, mientras que la G160E conservó una buena parte de la sensibilidad a estriquina (F63A, 1.7 ± 3.1 % de inhibición; G160E, 48.5 ± 13.9 % de inhibición, ambas a una concentración de 2 μM de estriquina). En conjunto, estos datos demuestran que residuos específicos en el sitio ortostérico de $\alpha 1$ GlyR son necesarios para la modulación funcional de los alcaloides de *Gelsemium*. Dadas las similitudes estructurales entre las diferentes subunidades del GlyR, es posible sugerir que las acciones funcionales de estos alcaloides en GlyR compuestos por subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$ también dependerían de estos residuos conservados presentes en el sitio ortostérico.

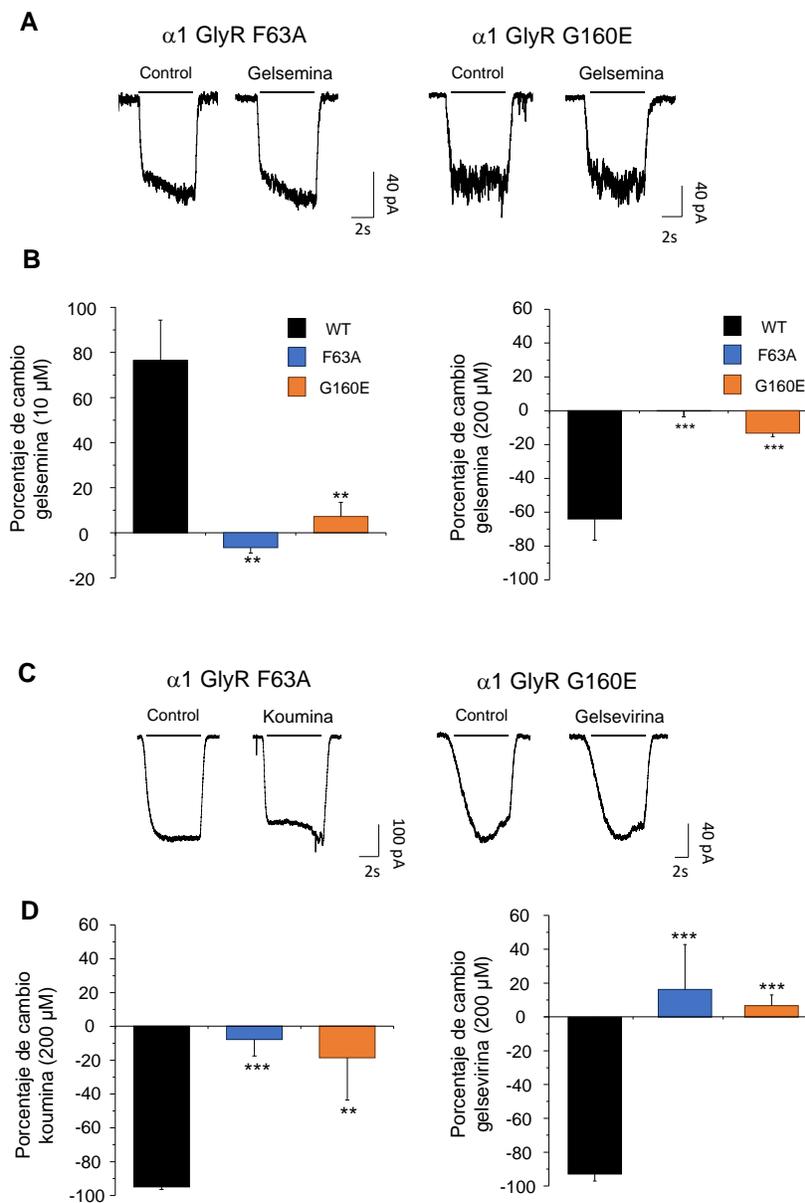


Figura 21. Efectos de alcaloides del *Gelsemium* en $\alpha 1$ GlyRs con mutaciones puntuales en residuos del sitio ortostérico. A-B. Los trazos de corriente y los gráficos resumen los efectos de las mutaciones puntuales F63A y G160E en la potenciación e inhibición inducida por la aplicación de gelsemina (10 μ M o 200 μ M) a $\alpha 1$ GlyR mutados y *wild-type*. **C-D.** Los trazos de corriente y los gráficos resumen

el porcentaje de inhibición generado por la aplicación de koumina y gelsevirina (200 μ M) a α 1GlyR mutados y *wild-type*. La potenciación y la inhibición disminuyeron significativamente (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ANOVA seguido de la prueba post hoc de Bonferroni). Los datos son promedios \pm SEM de 5-8 células.

4.5. Acciones de los alcaloides de *Gelsemium* en la transmisión sináptica espontánea.

Nuestros resultados en receptores recombinantes y nativos sugieren que los alcaloides de *Gelsemium* modulan las corrientes evocadas por GABA y glicina a través de interacciones con los sitios ortostéricos de GlyRs y de GABA_ARs. Estudios previos de nuestro grupo han reportado que la aplicación de gelsemina disminuyó significativamente la frecuencia de las corrientes inhibitorias postsinápticas en miniatura glicinérgicas de neuronas espinales en cultivo, sin modificar la amplitud (Lara et al., 2016). A la fecha, se desconoce si gelsemina también modifica la neurotransmisión GABAérgica. Para contestar esta interrogante, estudiamos el impacto de gelsemina en la actividad sináptica GABAérgica de neuronas corticales en cultivo (Figura 21 y Tabla 8). Las corrientes postsinápticas en miniatura GABAérgicas (GABA-mIPSCs) fueron aisladas mediante la aplicación conjunta de bloqueadores glutamatérgicos (CNQX y AP5) junto con el bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje, TTX. Las neuronas corticales en cultivo no muestran eventos sinápticos glicinérgicos debido a la ausencia de liberación sináptica de glicina (Zeilhofer et al., 2012). Sin embargo, estas neuronas expresan GlyR funcionales, los que aún podrían modularse por gelsemina (McCracken et al., 2017). Para estudiar la sinapsis GABAérgica en ausencia de acciones derivadas de la

interacción de gelsemina con GlyRs, incluimos el antagonista glicinérgico estricnina. Bajo estas condiciones, la aplicación del antagonista GABAérgico bicuculina bloqueó completamente la detección de corrientes sinápticas, confirmando su naturaleza GABAérgica (datos no mostrados).

Las mIPSCs GABAérgicas se obtuvieron a -60 mV y mostraron una frecuencia promedio de 0.91 ± 0.23 Hz ($n=8$, Figura 22). La aplicación de 50 μ M de gelsemina redujo la frecuencia de los GABA-mIPSCs en todas las neuronas registradas. Gelsemina disminuyó la frecuencia promedio a un valor de 0.42 ± 0.16 Hz ($n = 8$) ($p<0.01$, t-Student pareado versus condición control) y alteró significativamente la probabilidad acumulada de intervalos inter-eventos (*, $P < 0,0001$; prueba de Kolmogorov-Smirnoff). A pesar de la reducción de la frecuencia, todas las neuronas mostraron algunos GABA-mIPSCs en presencia del alcaloide. Estos eventos sinápticos GABAérgicos mostraron una amplitud promedio inalterada en ausencia o en presencia del alcaloide (Control, 33.3 ± 8.2 pA; Gelsemina, 24.8 ± 4.3 pA, $p=0.15$, t-Student pareado versus condición control). Por otra parte, el alcaloide no modificó la cinética de los eventos GABAérgicos. El tiempo de subida y el tiempo de decaimiento de los GABA-mIPSCs no fue significativamente diferente en presencia o ausencia de gelsemina ($p=0.88$ y $p=0.79$, respectivamente, t de Student no pareado versus condición control). Estos resultados indican que gelsemina reduce la frecuencia de las mIPSC GABAérgicas sin modificar la función de los GABA_AR postsinápticas, lo que sugiere un mecanismo presináptico de modulación.

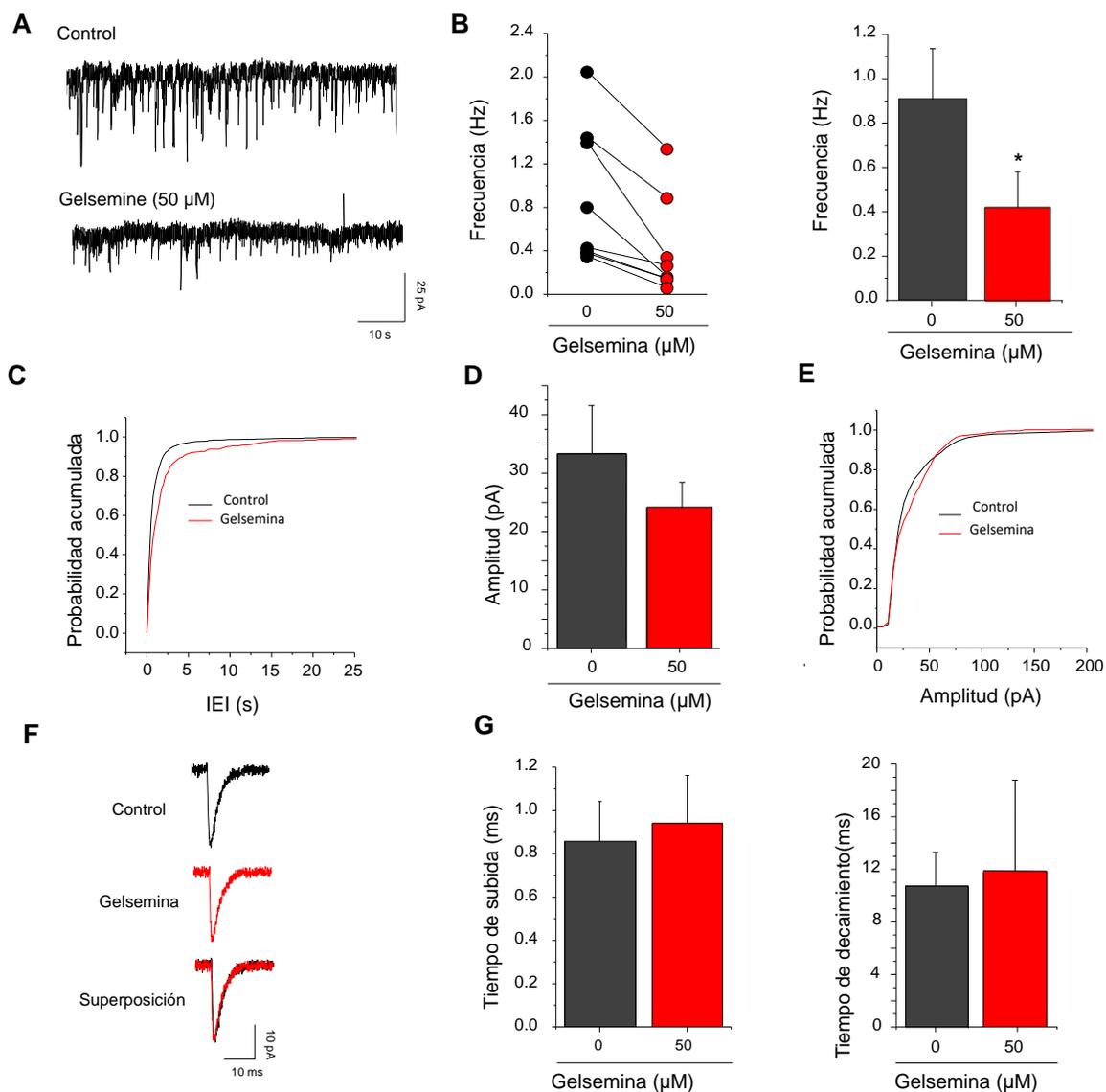


Figura 22. Modulación de gelsemina de la neurotransmisión GABAérgica. A.

Ejemplos de trazos de corriente que muestran la actividad sináptica GABAérgica antes y durante la aplicación de gelsemina. **B.** El gráfico de dispersión y el gráfico de barras resume el efecto de 50 μM de gelsemina en la frecuencia de los eventos sinápticos GABAérgicos en 8 neuronas. *, $P < 0.05$, t-Student pareado. **C.** Gráfico de probabilidad acumulada de los intervalos inter-eventos de GABA-mIPSCs en

ausencia o presencia de 50 μM de gelsemina. La distribución fue significativamente alterada por el alcaloide. $P < 0.0001$; Test de Kolmogorov-Smirnoff. **D.** El gráfico de barras representa los efectos de gelsemina en la amplitud de los GABA-mIPSCs. Las diferencias no fueron significativas. **E.** Gráfico de probabilidad acumulada de las amplitudes de GABA-mIPSCs en ausencia o presencia de gelsemina. Las diferencias no fueron significativas. **F.** Trazos promedios de corrientes sinápticas GABAérgica antes y durante la aplicación de 50 μM de gelsemina. **G.** Los gráficos de barras resumen los efectos de gelsemina sobre el tiempo de subida y el tiempo de decaimiento de los GABA-mIPSCs. Las diferencias no fueron significativas.

Para continuar profundizando en la modulación sináptica de gelsemina, exploramos si el alcaloide es capaz de afectar las corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura glutamatérgicas (mEPSCs) de neuronas corticales en cultivo (Figura 23). Estudios previos de nuestro grupo han reportado que la aplicación de gelsemina disminuyó significativamente la frecuencia de las mEPSCs de neuronas espinales en cultivo, sin modificar la amplitud (Lara et al., 2016). De manera similar, evaluamos las mEPSCs en ausencia y presencia de 50 μM de gelsemina (Figura 23 y Tabla 8). Para evitar cualquier efecto mediado por gelsemina relacionado con la modulación de GlyR o GABA_AR, las mEPSCs se aislaron farmacológicamente mediante la aplicación de TTX junto con estricnina y bicuculina. Nuestros resultados mostraron que la aplicación de 50 μM de gelsemina disminuyó significativamente la frecuencia de las mEPSCs en todas las neuronas registradas (Figura 23). La frecuencia promedio (Control = 0.72 ± 0.16 Hz; Gelsemina = 0.40 ± 0.11 Hz, $n=8$; $p < 0.01$, t de Student pareado) y la distribución de probabilidad

acumulada de los intervalos inter-eventos también fueron reducidos significativamente por el alcaloide (*, $P < 0.0001$; test de Kolmogorov-Smirnoff). Gelsemina no modificó la amplitud promedio (28.8 ± 2.9 pA a 26.4 ± 3.1 pA, $p=0.98$, t-Student pareado) ni los parámetros de tiempo de subida o de decaimiento de las mEPSCs (Figura 23D-G). Experimentos adicionales demostraron que la aplicación de $100 \mu\text{M}$ de gelsemina eliminó la presencia de eventos GABAérgicos y glutamatérgicos detectables ($n=4$ neuronas por condición, frecuencia igual a cero en ambos casos).

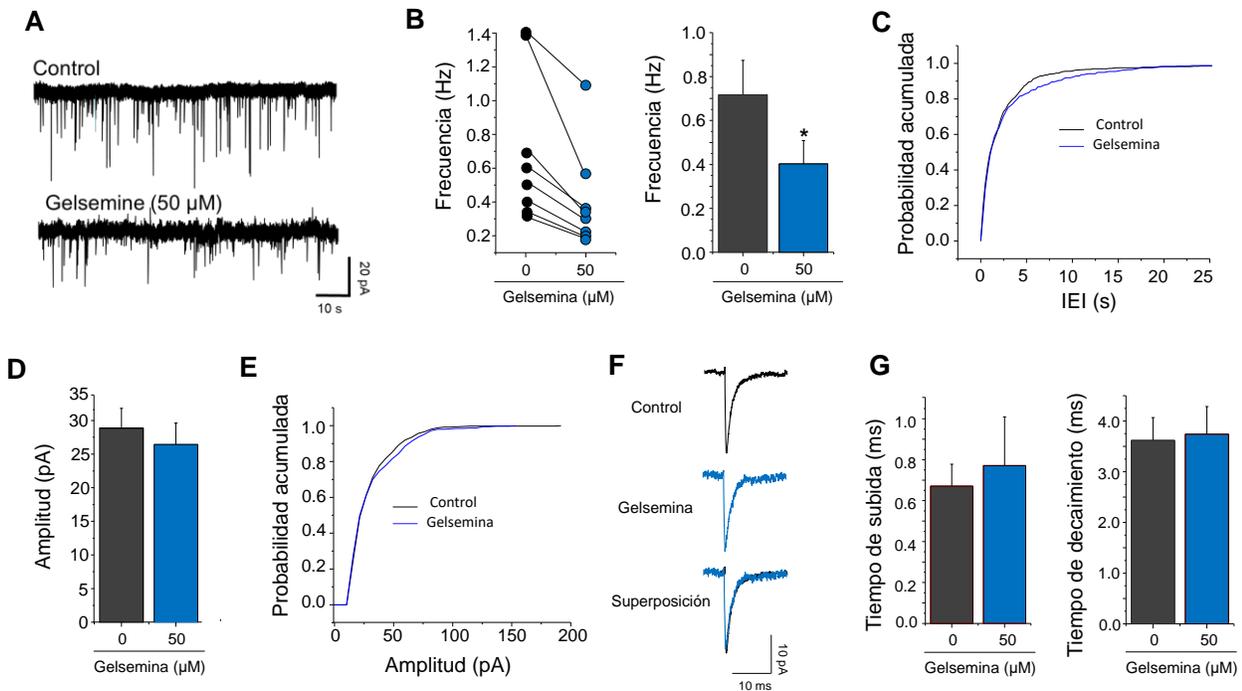


Figura 23. Modulación de la neurotransmisión glutamatergica por gelsemina.

A. Ejemplos de trazos de corriente que muestran la actividad sináptica glutamatergica antes y durante la aplicación de gelsemina. **B.** El gráfico de dispersión y el de barras resume el efecto de 50 μM de gelsemina en la frecuencia de los eventos sinápticos glutamatergicos en 8 neuronas. *, $P < 0.05$, t-Student pareado. **C.** Gráfico de probabilidad acumulada de los intervalos inter-eventos de mEPSCs en ausencia o presencia de 50 μM de gelsemina. La distribución fue significativamente alterada por el alcaloide. $P < 0.0001$; Test de Kolmogorov-Smirnoff. **D.** El grafico de barras representa los efectos de gelsemina en la amplitud de los mEPSCs. Las diferencias no fueron significativas. **E.** Gráfico de probabilidad acumulada de las amplitudes de mEPSCs en ausencia o presencia de gelsemina. Las diferencias no fueron significativas. **F.** Trazos promedios de corrientes

sinápticas glutamatérgicas antes y durante la aplicación de 50 μ M de gelsemina. **G.** Los gráficos de barras resumen los efectos de gelsemina sobre el tiempo de subida y el tiempo de decaimiento de los mEPSCs. Las diferencias no fueron significativas.

Tabla 8. Efectos de la gelsemina sobre mIPSC GABAérgicas y mEPSC glutamatérgicas de neuronas corticales en cultivo

	Frecuencia (Hz)	Amplitud (pA)	Tiempo de subida (ms)	Tiempo de decaimiento (ms)	N	n
mIPSCs	0.91 \pm 0.23	33.3 \pm 8.2	0.86 \pm 0.18	10.72 \pm 2.62	8	912
+ Gelsemina	0.42 \pm 0.16*	24.8 \pm 4.3	0.94 \pm 0.22	11.79 \pm 6.92	8	538
mEPSCs	0.72 \pm 0.16	28.8 \pm 2.9	0.67 \pm 0.11	3.62 \pm 0.45	8	1724
+ Gelsemina	0.40 \pm 0.11*	26.4 \pm 3.1	0.77 \pm 0.24	3.74 \pm 0.55	8	912

*, P<0.05, prueba t de Student pareada. Se utilizó una concentración de 50 μ M de gelsemina. n, número de eventos analizados, N, número de células.

En conjunto, estos resultados demuestran que gelsemina redujo la frecuencia de las corrientes sinápticas inhibitorias y excitatorias de neuronas corticales en cultivo, posiblemente a través de efectos a nivel presináptico. Dado que estas acciones parecen ser independientes de la actividad de GlyRs o de GABA_ARs, estos ensayos sugieren que gelsemina interacciona con blancos proteicos adicionales en las sinapsis. Para explorar esta idea, evaluamos el impacto de la gelsemina en las señales espontáneas de Ca²⁺ intracelular utilizando técnicas de fluorimetría (Figura 24). Debido a que el proceso de fusión de vesículas y liberación de neurotransmisores comprende fluctuaciones dinámicas de Ca²⁺ en las neuronas, las mediciones de las señales de Ca²⁺ podrían proporcionar información adicional sobre las acciones de la gelsemina a nivel sináptico. Las señales espontáneas de

Ca²⁺ intracelular representan actividad neuronal que puede estar relacionada con la transmisión sináptica y, en menor medida, con cambios relacionados con la acción en la conductancia de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Hammond & Esclapez, 2015; Hammond & Michel, 2015). A través del análisis de registros de 10 minutos, primero determinamos que la frecuencia promedio de las señales espontáneas de Ca²⁺ intracelular, en ausencia de cualquier bloqueador de canales iónicos, fue de aproximadamente 0.04-0.05 Hz (Figura 24). La aplicación de 50 o 100 μM de gelsemina disminuyó significativamente la frecuencia de eventos de Ca²⁺. La adición de 50 μM de gelsemina redujo la frecuencia de las fluctuaciones de Ca²⁺ (de 0.041 ± 0.002 Hz a 0.029 ± 0.002 Hz (****, p < 0.0001, t-Student no pareada), lo que se traduce en un cambio porcentual de una reducción de 66.03 ± 4.79 % del control (N = 7; n =218, donde N es el número de muestras y n es el número de células evaluadas) (****, p<0.0001, t-Student no pareado). Por otra parte, la incorporación de 100 μM del alcaloide bloqueó casi por completo la aparición de señales de Ca²⁺ en estas neuronas (Figura 24). La frecuencia disminuyó de 0.048 ± 0.003 Hz a 0.006 ± 0.004 (****, p <0.0001, prueba t-Student no pareada) y el cambio porcentual disminuyó a 4.48 ± 1.03 % del control (N = 4, n=55, ****, p<0.001, t-Student no pareado).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que gelsemina reduce la transmisión excitatoria e inhibitoria, y a la vez, disminuye las señales espontáneas de Ca²⁺ intracelular. Estos efectos sugieren que el alcaloide promueve, de manera rápida, una reducción importante de la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria,

posiblemente a través de una reducción en la cantidad de Ca^{2+} necesaria para una correcta liberación de vesículas sinápticas en la zona presináptica.

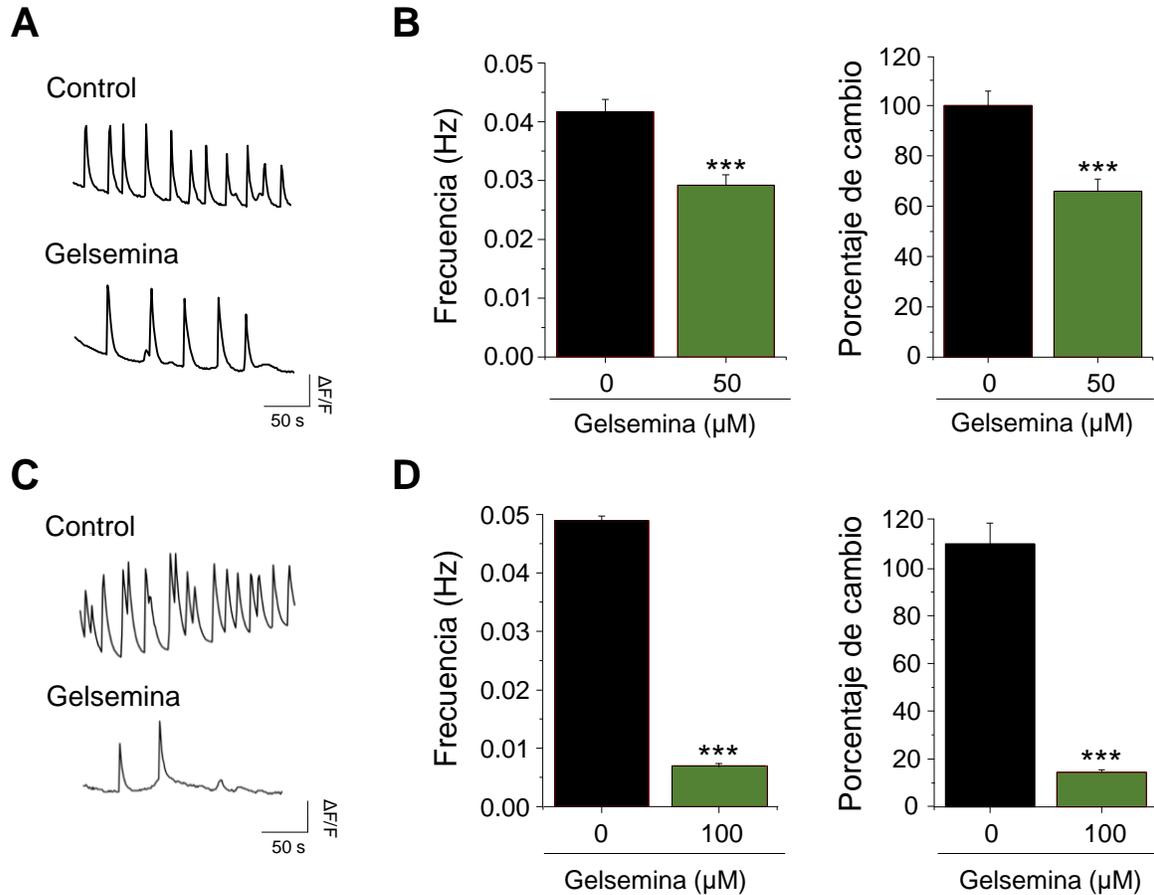


Figura 24. Efectos de gelsemina sobre la frecuencia de señales espontáneas de calcio intracelular. A-C. Trazos representativos de señales de calcio intracelular de neuronas corticales en ausencia y presencia de 50 μM (A) o 100 μM (C) de gelsemina. **B-D.** Los gráficos de barras resumen la frecuencia promedio de las señales de calcio intracelular y el cambio porcentual de la frecuencia durante la aplicación de 50 μM o 100 μM de gelsemina. Las diferencias fueron significativas (****, $P < 0.0001$, t-Student no pareado).

Las evidencias anteriormente presentadas sugieren que gelsemina posee acciones presinápticas, las cuales posiblemente no estarían relacionadas con la modulación directa de GlyRs y GABA_ARs. Estas evidencias sugieren que otros alcaloides del *Gelsemium* podrían tener efectos sinápticos similares a gelsemina. Sin embargo, nuestros estudios sugieren que sólo algunos tipos de alcaloides del *Gelsemium* ejercen acciones directas sobre la función de GlyRs y GABA_ARs. En este sentido, nuestros estudios mostraron que gelsemina y gelsevirina, ambos alcaloides del tipo gelsemina, y koumina, alcaloide del tipo koumina, poseen acciones directas sobre GlyRs y GABA_ARs (Figuras 15, 16, y 17, y Tabla 6). Por otra parte, humantenmina, alcaloide del tipo gelsedina, no mostró actividad en sobre GlyRs y GABA_ARs (Figuras 15 y 18 y Tabla 6). Para investigar si la actividad directa de los alcaloides del *Gelsemium* sobre GlyRs y GABA_ARs es necesaria para la modulación sináptica, realizamos experimentos electrofisiológicos similares a los descritos anteriormente (Figuras 22 y Tabla 8) con humantenmina, alcaloide inactivo como modulador directo de ambos canales iónicos inhibitorios. En estos experimentos, los GABA-mIPSCs fueron aislados mediante la aplicación conjunta de bloqueadores glutamatérgicos (CNQX y AP5) junto con el bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje, TTX, y el inhibidor glicinérgico estricnina.

La aplicación de 50 μ M de humantenmina redujo la frecuencia de los GABA-mIPSCs en todas las neuronas registradas (Figura 25). El alcaloide disminuyó la frecuencia promedio desde 0.42 ± 0.20 Hz a 0.21 ± 0.10 Hz ($n=4$) ($p<0.05$, t de Student pareado) y alteró significativamente la probabilidad acumulada de intervalos inter-eventos (*, $P < 0.0001$; prueba de Kolmogorov-Smirnoff). A pesar de la

reducción de la frecuencia, todas las neuronas mostraron algunos GABA-mIPSCs en presencia del alcaloide. Estos eventos sinápticos GABAérgicos restantes mostraron una amplitud promedio inalterada en ausencia o en presencia del alcaloide (Control, 21.6 ± 1.5 pA; humantenmina, 22.2 ± 2.4 pA, $p = 0.85$, t de Student pareado). Por otra parte, el alcaloide no modificó la cinética de los eventos GABAérgicos. El tiempo de subida y el tiempo de decaimiento de los GABA-mIPSCs no fue significativamente diferente en presencia o ausencia de gelsemina (Figura 25). Estos resultados indican que humantenmina, al igual que gelsemina, reduce la frecuencia de las mIPSC GABAérgicas sin modificar la función de los GABA_AR postsinápticos, lo que sugiere un mecanismo presináptico de modulación. Por otra parte, estos resultados demuestran que los efectos sinápticos de estos alcaloides no requieren acciones directas sobre GABA_ARs o GlyRs.

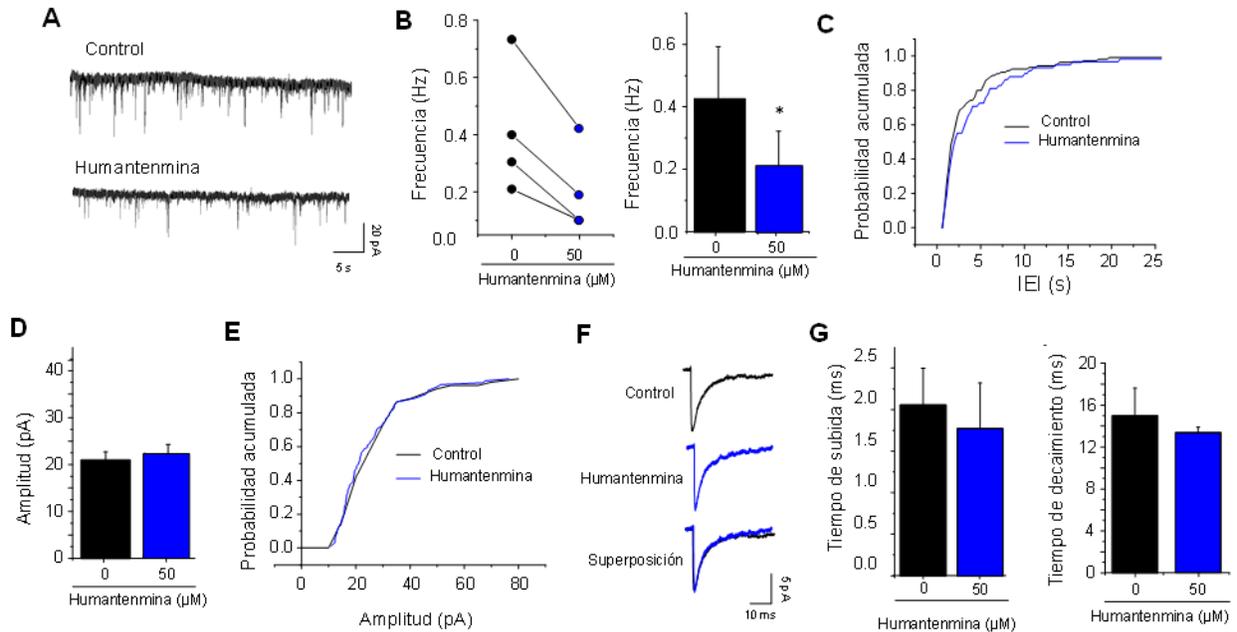


Figura 25. Modulación inducida por humanenmina de la neurotransmisión

GABAérgica. A. Ejemplos de trazos de corriente que muestran la actividad

sináptica GABAérgica antes y durante la aplicación de humanenmina 50 μM . **B.** El

gráfico de dispersión y el gráfico de barras resume el efecto de 50 μM de

humanenmina en la frecuencia de los eventos sinápticos GABAérgicos en 4

neuronas. *, $P < 0.05$, t de Student pareado. **C.** Gráfico de probabilidad acumulada

de los intervalos inter-eventos de GABA-mIPSCs en ausencia o presencia de 50 μM

de humanenmina. La distribución fue significativamente alterada por el alcaloide.

$P < 0.0001$; Test de Kolmogorov-Smirnoff. **D.** El gráfico de barras representa los

efectos de humanenmina en la amplitud de los GABA-mIPSCs. Las diferencias no

fueron significativas. **E.** Gráfico de probabilidad acumulada de las amplitudes de

GABA-mIPSCs en ausencia o presencia de humanenmina 50 μM . Las diferencias

no fueron significativas. **F.** Trazos promedios de corrientes sinápticas GABAérgica

antes y durante la aplicación de 50 μ M de humantenmina. **G**. Los gráficos de barras resumen los efectos de humantenmina sobre el tiempo de subida y el tiempo de decaimiento de los GABA-mIPSCs. Las diferencias no fueron significativas.

5. DISCUSION.

Un conjunto creciente de evidencia ha revelado las acciones biológicas mediadas por los alcaloides presentes en las plantas de *Gelsemium*. Hasta la fecha, se han identificado más de 100 alcaloides provenientes de *Gelsemium* (Jin et al., 2014). La investigación actual se ha centrado principalmente en los alcaloides indólicos más abundantes de estas plantas, los cuales son la gelsemina, gelsevirina, koumina y humantenmina. Como se ha mencionado anteriormente, estos compuestos han sido extensamente documentados por sus diversas actividades biológicas contra estados patológicos, tales como el crecimiento tumoral (Huang et al., 2010; Zhang et al., 2015), la hiperlipidemia (T. Wu et al., 2015), el dolor crónico (Jin, He, et al., 2018b; Ling et al., 2014; Liu et al., 2011; Qiu et al., 2015; Que et al., 2021; Rana Muhammad et al., 2019; Rujjanawate et al., 2003; Shoaib et al., 2019; Vitet et al., 2018; Y. E. Wu et al., 2015; Xiong et al., 2017; Y. Xu et al., 2012; Zhang et al., 2013; Zhang & Wang, 2015), la ansiedad (Chen et al., 2017; Liu et al., 2013; Lu et al., 2023; Meyer et al., 2013; Xiong et al., 2022) y la enfermedad de Alzheimer (Chen et al., 2020). A pesar de sus acciones beneficiosas, la toxicidad de estos alcaloides ha sido consistentemente demostrada mediante ensayos *in vivo* con extractos de *Gelsemium* y alcaloides purificados (Jin et al., 2014; Li et al., 2022). Aunque presenta relevancia etnofarmacológica y un potencial farmacológico, los blancos moleculares y los mecanismos involucrados en los efectos de los alcaloides de *Gelsemium* aún no están completamente claros. En particular, existe escasa información a nivel molecular, bioquímica y funcional que describa las interacciones de estos alcaloides con blancos proteicos del SNC. En este contexto, utilizando

registros electrofisiológicos combinados con mutagénesis y modelamiento molecular, en este trabajo se describen las interacciones moleculares involucradas en la modulación funcional de GlyRs y GABA_ARs por los alcaloides indólicos más destacados de *Gelsemium*. Además, mediante registros electrofisiológicos y microfluorimetría de Ca²⁺ intracelular se determinaron los efectos de gelsemina y humantenmina sobre la actividad sináptica espontánea de neuronas corticales.

En termino generales, podemos concluir que estos alcaloides presentan una actividad principalmente inhibitoria sobre GlyRs y GABA_ARs, exceptuando humantenmina, el cual, a pesar de la similitud química y estructural con el resto de los alcaloides, no mostró actividad detectable en estos receptores. A pesar de esto, tanto humantenmina y gelsemina fueron capaces de modular la actividad sináptica, posiblemente a través de blancos moleculares diferentes a GABA_ARs y GlyRs. Para un mejor ordenamiento, a continuación, se discutirán aspectos específicos de los alcances de los hallazgos obtenidos.

5.1. Modulación de GlyRs y GABA_ARs por alcaloides de la planta *Gelsemium*.

Como se ha mencionado previamente, los GlyR y GABA_AR desempeñan un papel fundamental en el control inhibitorio y la modulación del SNC. Ambos canales han sido vinculados a diversos procesos neurofisiológicos de importancia crítica. En primer lugar, la actividad de los GlyR está implicada en procesos tan relevantes como la coordinación y actividad motora, la sincronización respiratoria, así como en el procesamiento e integración sensorial, incluidas las señales nociceptivas. Por otro lado, la activación de los GABA_AR regula múltiples procesos neurofisiológicos,

tales como el tono muscular, la ansiedad, el procesamiento multisensorial, coordinación cognitiva, la formación de memoria y la percepción del dolor, entre otros. (Fritschy, 2015; Rudolph & Möhler, 2004; Zeilhofer, Wildner, et al., 2012).

En consonancia con su relevancia fisiológica, se ha explorado ampliamente la farmacología de los GABA_AR (Möhler, 2012; Sieghart, 2015). Por el contrario, a la fecha no existe ningún fármaco que tenga como blanco específico a los GlyRs. A pesar de ello, ambos receptores poseen ligandos agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos provenientes de diversos orígenes, incluyendo moduladores purificados de hongos y plantas, así como moléculas endógenas y compuestos de diseño sintético (Lara et al., 2020).

En base con la evidencia previamente descrita sobre la actividad biológica de los alcaloides de *Gelsemium* por nuestro grupo de investigación (Lara et al., 2016), este trabajo se enfocó en expandir y definir los mecanismos relacionados a la modulación funcional de los GlyR y GABA_AR por los cuatro alcaloides más prominentes de *Gelsemium*: gelsemina, koumina y gelsevirina y humanenmina. Los estudios electrofisiológicos demostraron que los tres primeros ejercen acciones principalmente inhibitorias sobre corrientes evocadas GABAérgicas y glicinérgicas, mientras que, por otro lado, se determinó que la humanenmina no ejerce efectos detectables sobre estos canales iónicos.

La expresión de receptores recombinantes expresados en células HEK293 permitió definir la modulación de gelsemina sobre GABA_ARs de composición definida. Se decidió enfocar el estudio en las configuraciones mayormente

expresadas en el SNC, y que estuvieran asociadas principalmente a las acciones farmacológicas de las BDZ (Cerne et al., 2022; Ghit et al., 2021; Knoflach & Bertrand, 2021). Se encontró que todas las configuraciones estudiadas fueron inhibidas por gelsemina de manera similar, lo que indica la ausencia de efectos selectivos hacia configuraciones específicas. Esta similitud es consistente con el alto grado de homología de los sitios ortostéricos de estas configuraciones de GABA_AR. En concordancia con estas observaciones, gelsemina también fue capaz de inhibir los GABA_AR nativos expresados en neuronas corticales en cultivo, los cuales también presentaron sensibilidad a BDZ. A pesar de la heterogeneidad de las configuraciones de GABA_AR expresadas en estas neuronas, el IC₅₀ y la inhibición de la corriente máxima fueron comparables con los resultados de los GABA_AR recombinantes. En un contexto más amplio, los resultados aquí informados nos permiten generar un perfil más completo de las acciones de gelsemina en GABA_AR y GlyRs. La comparación de los valores de IC₅₀ calculados para los efectos de gelsemina en GlyRs ($\approx 30\text{-}50\ \mu\text{M}$, Lara et al., 2016) versus los obtenidos para GABA_AR ($\approx 55\text{-}90\ \mu\text{M}$) y las inhibiciones máximas registradas para cada canal ($\approx 80\text{-}95\%$ de inhibición de GlyR versus $\approx 45\text{-}55\%$ de inhibición de GABA_AR), sugiere que los GlyR son más sensibles a la gelsemina que los GABA_AR. Los ensayos con koumina y gelsevirina mostraron una eficacia similar para todas las configuraciones de GlyR estudiadas, obteniéndose inhibiciones máximas de alrededor de $\approx 90\%$, similares a gelsemina. Las acciones de estos alcaloides sobre GABA_AR nos permiten sugerir que, al igual que gelsemina, koumina y gelsevirina poseerían una menor eficacia sobre GABA_AR en comparación a GlyR.

El presente estudio además determinó que humantenmina no ejerce cambios detectables sobre la función de estos canales iónicos. Estudios *in silico* e *in vivo* previamente publicados han propuesto posibles interacciones de humantenmina con diversos canales iónicos, lo que incluye receptores de acetilcolina nicotínicos (Pedroni et al., 2023), receptores NMDA (Huang et al., 2021), GABA_ARs y GlyRs (Li et al., 2022). Estos autores asociaron la elevada toxicidad de este alcaloide a acciones directas en estos canales. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren consistentemente que las acciones de humantenmina no estarían relacionados a la modulación funcional de GABA_ARs y GlyRs. Sin embargo, la evidencia a la fecha no descarta que interacciones de este alcaloide sobre otros canales y proteínas relevantes para el funcionamiento del SNC estén involucradas.

En resumen, los hallazgos de este trabajo proporcionan un avance sustantivo en la caracterización funcional de los efectos de gelsemina, koumina y gelsevirina en GABA_AR y GlyR. Sin embargo, a pesar de sus similitudes química, los datos obtenidos descartan acciones directas de humantenmina con estos canales, sugiriendo un margen de especificidad interesante de diferentes grupos de alcaloides del *Gelsemium* en receptores inhibitorios y posiblemente en otros tipos de canales (Figura 26).

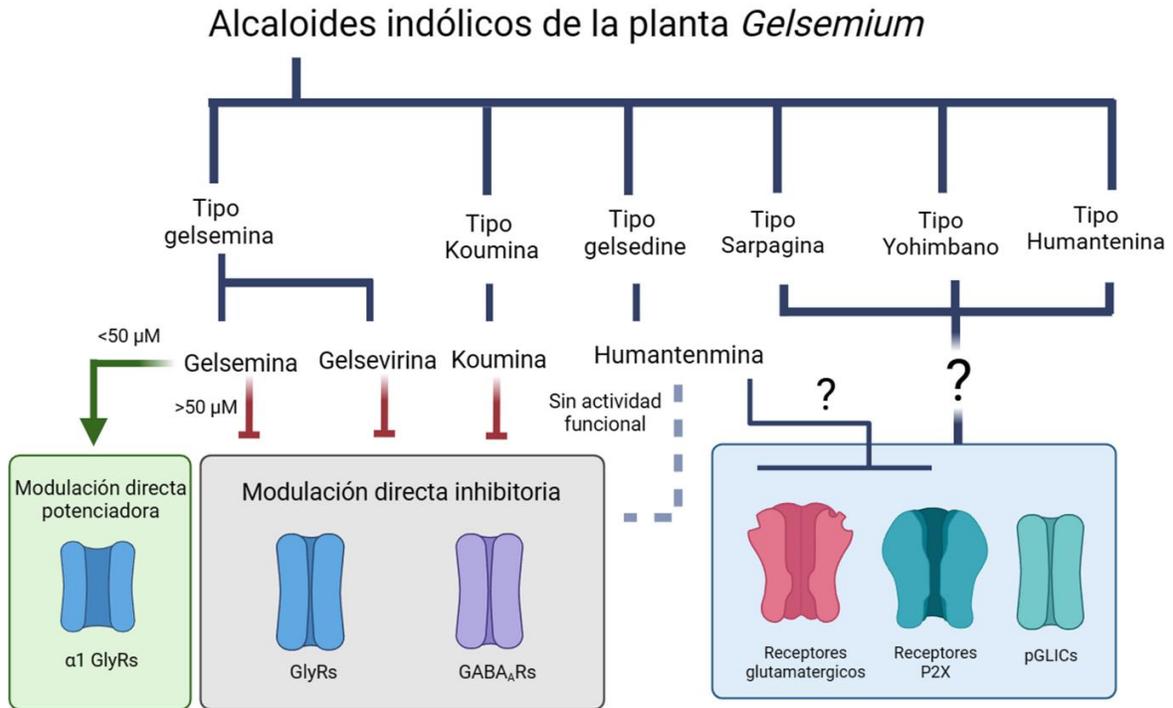


Figura 26. Resumen esquemático de la actividad de los principales alcaloides de la planta *Gelsemium* sobre GABA_ARs y GlyRs. El esquema resume las evidencias funcionales sobre la actividad de los 6 grupos de alcaloides de *Gelsemium* sobre canales iónicos activados por ligando del SNC.

5.2. Sitios moleculares y mecanismos asociados a la modulación de GlyRs y GABA_ARs por alcaloides del *Gelsemium*.

A la fecha, se desconocen los mecanismos y sitios moleculares involucrados en la modulación de los GABA_AR y GlyR por los alcaloides del *Gelsemium*. Los resultados presentados mostraron que gelsemina es capaz de disminuir la afinidad aparente de GABA_AR nativos por GABA sin generar cambios significativos en las corrientes máximas o en las tasas de desensibilización. Estos datos son cualitativamente similares a lo reportados anteriormente para GlyRs, donde

gelsemina aumentó desplazó el EC₅₀ del agonista sobre GlyR recombinantes (Lara et al, 2016). Coincidente con estas evidencias, estudios adicionales de otros grupos mostraron que gelsemina desplazó la unión de la ³H-estricnina en tejido de médula espinal (Shoaib et al., 2019). Aunque estos datos en conjunto sugieren que gelsemina pudiera actuar como un antagonista competitivo en ambos canales iónicos, aun no existe información molecular o estructural de la unión de gelsemina u otro alcaloide del *Gelsemium* al sitio ortostérico de GABA_AR o GlyR.

Los estudios de esta tesis centrados en las configuraciones de GABA_AR insensibles a BDZ han generado resultados contrarios a las hipótesis planteadas por otros grupos de investigación, los cuales han propuesto posibles interacciones de estos alcaloides con el sitio de unión a BDZ (Meyer et al., 2013; Liu et al., 2013). Los hallazgos de este trabajo indican que los efectos inhibitorios de gelsemina sobre los GABA_AR solo requieren la presencia de las subunidades α y β , descartando la participación de las subunidades γ 2 y del sitio de unión a BDZ. No obstante, es importante señalar que los GABA_AR compuestos por subunidades α y β poseen, además del sitio ortostérico, sitios alostéricos para diversos ligandos, como propofol y neuroesteroides, según lo documentado por Olsen et al. (2019) y Kim & Hibbs (2021). Por lo tanto, potenciales acciones de gelsemina a través de estos sitios no pueden descartarse. De modo interesante, la información estructural proporcionada por el grupo del Dr. Burgos (Sección Anexos, Figura 1) sugiere que solo un porcentaje mínimo de complejos gelsemina-GABA_AR se localizan en los dominios TM, mientras que más del 90% de las interacciones se distribuye en el ECD, en sitios cercanos al ortostérico. Una mirada detallada de estas interacciones putativas

muestra que la unión de gelsemina, koumina, gelsevirina y humantenmina al sitio ortostérico posee perfiles energéticos favorables, que sugieren una interacción ligando-receptor. Estas evidencias *in silico*, sumadas a los datos funcionales, sugieren que, al menos en parte, la unión de gelsemina al sitio ortostérico es uno de los mecanismos de acción más probables para explicar las acciones funcionales de los alcaloides del *Gelsemium* en GABA_ARs.

Este trabajo además evaluó en profundidad los sitios moleculares involucrados en la modulación del GlyR por estos alcaloides. En una primera etapa, se analizó la formación de complejos alcaloide-GlyR mediante metodologías *in silico* (Sección Anexos, Figura 2 y 3). Estos estudios mostraron que, al igual que en GABA_ARs, la mayoría de las interacciones putativas entre los alcaloides y el GlyR se posicionaron en el ECD y en el sitio ortostérico. El análisis de los perfiles energéticos de estos complejos sugiere una interacción favorable entre los alcaloides y el sitio ortostérico del GlyR, lo cual es coincidente con evidencias de nuestro grupo y de otros investigadores. Sin embargo, la modulación bifásica de gelsemina de GlyRs compuestos de la subunidad $\alpha 1$ sugiere la existencia de más de un sitio de unión a este alcaloide, o de elementos estructurales diferenciadores presentes en esta subunidad y ausentes en las otras subunidades de los GlyR. En este sentido, es reconocido que sitios moleculares asociados a la modulación alostérica del GlyR han sido localizados en los dominios TM, entre los que se destacan el THC y el 2,6-di-*tert*-butilfenol (Acuña et al., 2016; Kumar et al., 2020). Para determinar si el ECD es la región clave en la modulación bifásica de gelsemina, se evaluó la sensibilidad a gelsemina de GlyR quiméricos, en los cuales los ECD de

las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ fueron intercambiados (Yévenes et al., 2010). Estos resultados mostraron las acciones positivas y negativas de gelsemina en las corrientes activadas por glicina son exclusivamente dependientes de la composición del ECD. Estos resultados indican que las interacciones putativas de gelsemina con sitios de los dominios TM detectadas en los ensayos *in silico* no tendrían relevancia en la modulación bifásica del alcaloide. Considerando estos resultados, luego investigamos directamente la relevancia del sitio ortostérico a través una combinación de estudios bioinformáticos con mutaciones puntuales y electrofisiología.

Estudios *in silico* mostraron que gelsemina, koumina, gelsevirina y humantenmina interaccionan con el sitio ortostérico de GlyRs con perfiles energéticos adecuados que permiten sugerir una interacción física entre los alcaloides y el sitio ortostérico de los GlyR (Sección Anexos, Figura 3-4). Los diagramas de interacción mostraron que los alcaloides funcionalmente activos (i.e. gelsemina, koumina y gelsevirina) interaccionan con una red de residuos del sitio ortostérico. De modo interesante, los residuos aromáticos logran estabilizar a los alcaloides mediante diversas fuerzas intermoleculares, destacando la interacción entre un nitrógeno cargado de estos alcaloides con residuos específicos. Contrariamente a lo anteriormente descrito, la humantenmina, aunque se posicionó en el sitio ortostérico, no mostró interacciones entre su estructura y residuos de esta zona (sección anexos, Figura 4).

Para validar estas la relevancia de estas interacciones experimentalmente, se estudiaron diversas mutaciones al sitio ortostérico. Sin embargo, es importante

considerar que mutaciones en esta región pudieran generar receptores no funcionales, debido a que pudieran afectar la unión del agonista glicina (Atak et al., 2015; Huang et al., 2015). Para evaluar el impacto de mutaciones al sitio ortostérico, se realizó un estudio bioinformático que determinó el impacto de diversas sustituciones de aminoácidos en la unión de gelsemina y del agonista glicina. Estos estudios mostraron que las mutaciones puntuales F63A, G160E y F207A en $\alpha 1$ GlyRs generaron variaciones en la unión de los alcaloides al sitio, pero conservando mayoritariamente la unión de glicina. Los registros electrofisiológicos de las mutaciones F63A y G160E fueron consistentes con los estudios bioinformáticos y demostraron que estas sustituciones afectaron la modulación del $\alpha 1$ GlyRs por gelsemina, koumina y gelsevirina. Estos resultados, en conjunto, permiten concluir que los alcaloides activos se comportan mayoritariamente como antagonistas competitivos de los GlyR. Además, se concluye que los efectos de potenciación específicos para gelsemina y $\alpha 1$ GlyRs dependen exclusivamente del ECD y, en gran parte, del sitio ortostérico. En este sentido, el efecto potenciador de gelsemina sobre $\alpha 1$ GlyR pudiera estar relacionado a residuos no conservados en el ECD entra la subunidad $\alpha 1$, y las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$, los cuales podrían encontrarse distantes al sitio de unión, modulando la estabilización del canal en estado abierto en presencia de gelsemina.

Los estudios discutidos en los párrafos anteriores describieron los determinantes moleculares necesarios para la modulación de los alcaloides del *Gelsemium* de GlyRs. Sin embargo, los requerimientos estructurales y fisicoquímicos necesarios para la actividad funcional de los alcaloides sobre el GlyR

se desconocen. En colaboración con el Dr. Burgos (Departamento de fisiología, Universidad de Concepción), desarrollamos algunos estudios de asociación entre la estructura química de estos alcaloides y su interacción con GlyRs para esclarecer esta interrogante. Según su estructura química, los alcaloides de tipo indol se clasifican en seis grupos: gelsemina, koumina, humantenina, gelsedina, sarpagina y yohimbano. En términos generales, estos alcaloides corresponden a derivados de la metabolización del aminoácido triptófano y poseen núcleos de oxindol o indol. Además, cada grupo de estos compuestos muestran características particulares, que pueden ir desde la presencia de metilos unidos a la estructura principal, o la inclusión de una estructura de jaula hexacíclica, lo que pudiera afectar significativamente su interacción con las proteínas. Los datos funcionales presentados en este estudio determinaron que los principales alcaloides de los grupos tipo gelsemina y tipo koumina son activos en GlyRs y GABA_ARs. Por el contrario, la humantenmina (o también conocida como gelsenicina), un miembro del grupo de la gelsedina, no mostró ninguna modulación detectable. Estructuralmente, la incorporación de un grupo metoxi en la posición del nitrógeno, como radical del grupo indol, como en el caso de gelsevirina, no cambió la modulación funcional en comparación con koumina, la cual no lo posee. Por otra parte, humantenmina también posee la incorporación de un grupo 1-metoxi al núcleo de oxindol, sin embargo, no fue capaz de ejercer acciones sobre estos receptores. Por lo tanto, estas simples observaciones señalan que las estructuras esenciales de tipo indol u oxindol probablemente son determinantes críticos para la actividad funcional, pero no son suficientes para ello. Un examen más detallado de las entidades químicas

que acompañan a los núcleos de indol u oxindol sugiere que el volumen molecular, flexibilidad y cargas presentadas en las estructuras cíclicas accesorias a los grupos indol, estarían relacionados con la inhibición funcional de GlyR y GABA_AR. Si bien el volumen de los núcleos de indol es similar en los alcaloides examinados, las estructuras adicionales en gelsemina, koumina y gelsevirina proporcionan un volumen tridimensional adicional, posiblemente permitiéndoles establecer interacciones más favorables con los residuos de los sitios ortostéricos. Por el contrario, la caja heterocíclica unida al grupo indol de la humantenmina posee menos volumen espacial, y una estructura globalmente más plana, lo que probablemente desfavorezca la capacidad de este alcaloide de establecer interacciones estables con estas proteínas. Para profundizar en estos requerimientos fisicoquímicos, se construyó un farmacóforo en base a los efectos funcionales de estos alcaloides en GlyRs. En estos estudios, se consideró además a la estriquina como molécula de referencia que interacciona con el sitio ortostérico. La descripción del farmacóforo mostro que los requerimientos estructurales para la acción funcional de estos alcaloides son: i. la presencia de 3 grupos hidrofóbicos, ii. la presencia de un anillo aromático, y iii. la presencia de un grupo nitrogenado cargado positivamente a pH=7.0 (Sección Anexos, Figura 5). Estos requisitos son cumplidos completamente por estriquina, gelsemina, koumina y gelsevirina. Contrariamente, humantenmina solo cumple con los dos primeros requisitos, no mostrando un grupo nitrogenado cargado positivamente. Consistente con estas observaciones, los diagramas de interacción *in silico* mostraron que los alcaloides funcionalmente activos interaccionan con residuos del sitio ortostérico en parte a

través de nitrógenos cargados posicionados dentro de las estructuras adicionales a los grupos indol u oxindol (Sección Anexos, Figura 4). Humantenmina, al no poseer este grupo cargado, no mostró interacciones con residuos de esta zona. En base a estos resultados, es posible sugerir que el presente trabajo proporciona un mecanismo integral para explicar la presencia o ausencia de modulación funcional de los GlyRs por estos alcaloides.

Los análisis de los sitios de unión de estos alcaloides en los GlyR sumados a la determinación de un farmacóforo para los alcaloides del *Gelsemium* respalda la idea de que variaciones sutiles en las estructuras químicas asociadas a los núcleos de tipo indol son los determinantes críticos que definen su actividad funcional. Por lo tanto, estos hallazgos abren la puerta para describir posibles relaciones estructura-actividad de diferentes grupos de alcaloides del *Gelsemium* para identificar y caracterizar nuevos moduladores GlyR o GABA_AR de origen natural. Este tipo de estudios abren la posibilidad de descubrir, por ejemplo, agonistas parciales o antagonistas específicos de subunidades para GlyRs, lo cual aún no ha sido descrito. A su vez, tampoco se puede descartar la posibilidad de que estos alcaloides, incluidos humantenmina, afecten la actividad de otros canales iónicos pertenecientes a esta familia, por ejemplo, los receptores de acetilcolina nicotínicos o de serotonina del tipo 3 (Pedroni et al., 2023). Estudios futuros que combinen ensayos funcionales con aproximaciones bioinformáticas pudieran contribuir a generar un perfil completo de los efectos funcionales de los alcaloides del *Gelsemium* sobre los canales iónicos del SNC.

5.3. Acciones de los alcaloides del *Gelsemium* en la sinapsis.

Los efectos de los alcaloides en los GABA_ARs y GlyRs recombinantes sugieren acciones a nivel de la sinapsis. Sin embargo, estos canales pueden estar presentes a nivel pre y postsináptico, y a su vez, pueden ejercer roles en la neurotransmisión sináptica rápida y en la inhibición tónica (Farrant & Nusser, 2005; Zeilhofer, Benke, et al., 2012). Con el objetivo de evaluar los posibles efectos regulatorios de los alcaloides sobre la función sináptica, se estudió los efectos de gelsemina y humantenmina en neuronas corticales en cultivo. Estos resultados mostraron que gelsemina disminuyó significativamente la frecuencia de mIPSC GABAérgicas y mEPSC glutamatérgicas de neuronas corticales. En ambos casos, la gelsemina no modificó la amplitud promedio ni la cinética de las corrientes sinápticas, sugiriendo una regulación presináptica. En base a estudios previos de nuestro grupo (Lara et al., 2016) y los datos presentados en este trabajo, se podría argumentar que gelsemina ejerció la modulación sináptica a través de GABA_AR o GlyR presinápticos. La relevancia de pLGIC presinápticos permeables al cloruro se ha demostrado previamente por otros grupos (Choi et al., 2013; Jang et al., 2006; McCracken et al., 2017; Schicker et al., 2008). Sin embargo, el diseño experimental empleado en los estudios de este trabajo no correlaciona con un papel potencial de GABA_AR o GlyR presinápticos en las acciones de gelsemina. Primero, los análisis electrofisiológicos en neuronas corticales se realizaron en presencia de estricnina, lo cual elimina una contribución de GlyRs tanto sinápticos como extrasinápticos. En segundo lugar, el aislamiento de los eventos glutamatérgicos se realizó utilizando bicuculina y estricnina, bloqueando farmacológicamente a los GABA_AR y GlyRs

respectivamente. En tercer lugar, la concentración de gelsemina utilizada para evaluar los efectos sinápticos no genera una modulación robusta de los GABA_AR. Cuarto, la aplicación de gelsemina disminuyó la frecuencia de las señales de calcio intracelular en nuestro sistema neuronal. Estas observaciones son consistentes con los efectos sinápticos encontrados con el alcaloide humanenmina, el cual, a pesar de no modular directamente la función de los GABA_AR y GlyR, fue capaz de disminuir la frecuencia en los eventos miniatura GABAérgicos. En conjunto, este análisis sugiere que la reducción en la frecuencia de las corrientes sinápticas inducida por gelsemina y humanenmina no requiere de la modulación directa de GlyRs o GABA_ARs por los alcaloides, sino que ocurre a través de una disminución de la entrada de calcio a las terminales presinápticas. Aunque no es posible descartar completamente un rol de la modulación de los GlyR o GABA_AR presinápticos por gelsemina, los datos de este trabajo sugieren que canales de calcio dependientes de voltaje, GPCR presinápticos u otras proteínas involucradas en la regulación de calcio, a nivel presináptico, podrían ser moduladas por estos alcaloides (Booker et al., 2020; Pernía-Andrade et al., 2009; Zhu & Pan, 2005). Por último, el efecto inhibitorio de la actividad sináptica observadas en este trabajo es consistente con el estudio publicado por el grupo de Wu y colaboradores (Y. E. Wu et al., 2015), el cual reporta que gelsemina revierte el aumento en la expresión de c-Fos en la corteza cingulada anterior producida en modelos neuropáticos de dolor y por lo cual concluyen, que posiblemente este alcaloide es capaz de inhibir la actividad neuronal. De este modo, los resultados obtenidos abren perspectivas novedosas para estudios adicionales enfocados en blancos moleculares para

diversos alcaloides del *Gelsemium* en la sinapsis de mamíferos (Figura 27). Experimentos futuros con preparaciones neuronales más intactas, como cortes de cerebro, sumados a la disección farmacológica y genética de blancos moleculares potenciales, pudieran ayudar a definir la naturaleza de las proteínas sensibles a estos alcaloides.

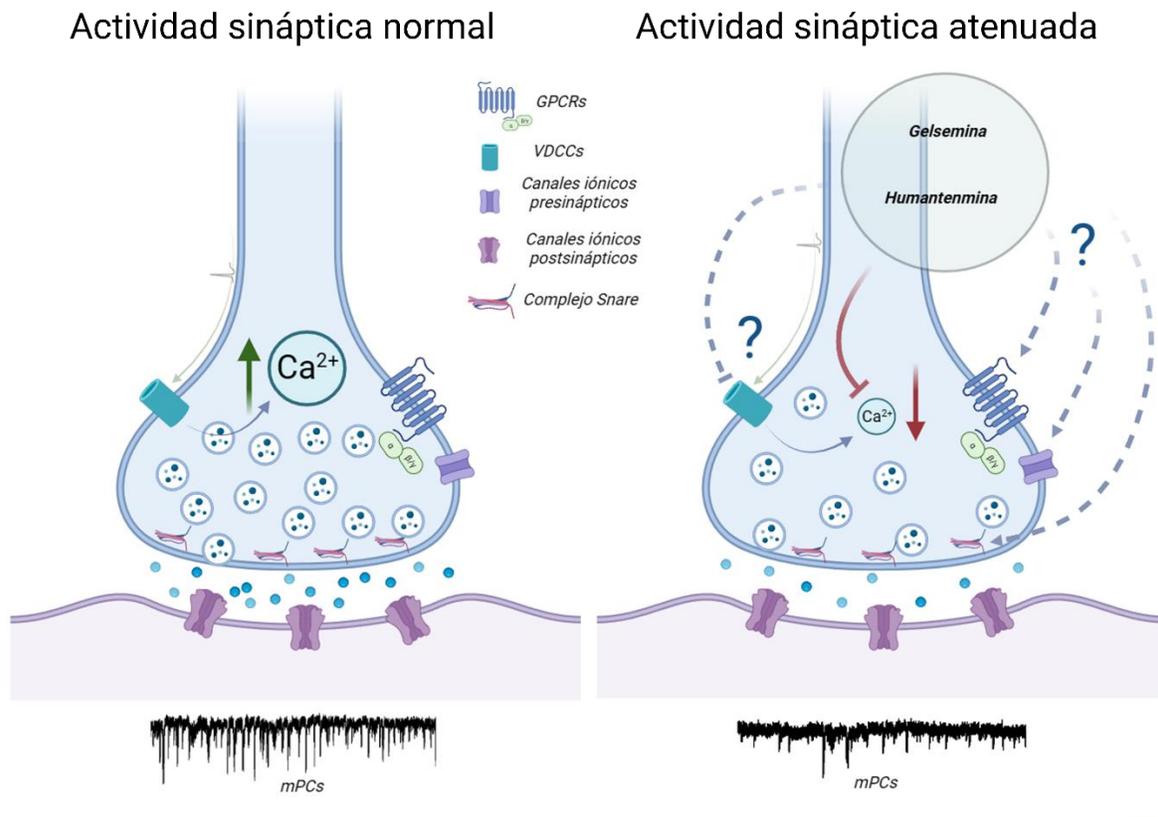


Figura 27. Esquema de las acciones y mecanismos posibles de los alcaloides del *Gelsemium* en la sinapsis. De acuerdo con nuestros resultados, los alcaloides de *Gelsemium* pudieran modular la actividad de elementos presinápticos, tales como canales de calcio voltaje dependientes, GPCRs, canales iónicos presinápticos y proteínas estructurales involucradas en liberación vesicular (mPSCs; de las siglas en ingles de corrientes postsinápticas miniaturas).

5.4. Implicancias de las acciones neurofisiológicas de los alcaloides del *Gelsemium* para sus efectos benéficos y tóxicos en modelos *in vivo*.

En relación con las acciones biológicas de los alcaloides de *Gelsemium* en sistemas *in vivo* y en humanos, este estudio contribuye, al menos en parte, a una mejor interpretación de sus propiedades y acciones. Gelsemina y koumina, hasta ahora los alcaloides más estudiados de acuerdo con la literatura publicada, comparten varias características. Por ejemplo, ambos han demostrado ejercer analgesia en diversos modelos preclínicos de dolor (Chen et al., 2020; Jin, He, et al., 2018b; Jin, Yue, et al., 2018; Lu et al., 2023; Shoaib et al., 2019; Y. E. Wu et al., 2015; Xiong, Jin, et al., 2021; Xiong, You, et al., 2021; Xiong et al., 2017; Y. Xu et al., 2012; Zhang et al., 2013; Zhang & Wang, 2015), efectos ansiolíticos (Chen et al., 2017; Liu et al., 2013; Meyer et al., 2013; Zhang et al., 2015) y efectos anti inflamatorios (Chen et al., 2020; Gui-lin et al., 2022; Jin et al., 2022; Lin et al., 2022; Lin et al., 2023; Xiong, Jin, et al., 2021; Yang et al., 2022). Varios de estos estudios han sugerido la participación de GlyRs y GABA_ARs en los mecanismos moleculares implicados en estas acciones beneficiosas. Particularmente, se ha propuesto que la unión directa y la consecuente activación de GlyRs por parte de estos alcaloides son eventos clave (Shoaib et al., 2019) para alcanzar los efectos analgésicos y ansiolíticos. A su vez, se ha sugerido que la activación de GlyRs mediada por los alcaloides gatillarían la producción de neuroesteroides endógenos, como la alopregnalona, lo que explicaría los efectos benéficos (Figura 28). Sin embargo, los datos funcionales publicados por nuestro grupo de investigación (Lara et al. 2016) y los resultados del presente trabajo han demostrado consistentemente que

los alcaloides de *Gelsemium* son principalmente antagonistas competitivos de GlyRs y GABA_ARs. Así, nuestros hallazgos descartan que los efectos ansiolíticos (Liu et al., 2013; Meyer et al., 2013), hipnóticos (Y. E. Wu et al., 2015) y analgésicos (Shoaib et al., 2019; Zhang et al., 2013; Zhang & Wang, 2015) de gelsemina estén mediados por la potenciación directa de GABA_AR sensibles a BDZ. Por lo tanto, la activación directa de estos receptores como un mecanismo para explicar los efectos analgésicos o ansiolíticos de estos alcaloides es controversial y no es coherente con las evidencias funcionales de las acciones directas de los alcaloides con los canales iónicos. Sin embargo, los resultados funcionales obtenidos con humantenmina se correlacionan de buena manera con observaciones previas, donde se demostró que este alcaloide no muestra efectos beneficiosos en modelos de ansiedad en roedores, en comparación con koumina, gelsemina y gelsevirina (Liu et al., 2013). Sin embargo, cabe destacar que las dosis y concentraciones utilizadas para investigar los efectos beneficiosos son generalmente inferiores a las concentraciones necesarias para una modulación robusta de GlyRs o GABA_ARs (Liu et al., 2013; Meyer et al., 2013). Concentraciones de gelsemina en el rango nanomolar se han asociado con la estimulación de la producción de neuroesteroides espinales y acciones analgésicas o ansiolíticas (Shoaib et al., 2019). En este sentido, la regulación de la actividad sináptica excitadora e inhibitoria mediada por gelsemina podría contribuir a explicar algunas de sus acciones terapéuticas. La atenuación de la actividad sináptica a nivel presináptico es un mecanismo común de fármacos clínicamente relevantes, como gabapentina, pregabalina y baclofeno (Alles et al., 2020; Taylor et al., 2007), los cuales, por interacción con diferentes

proteínas presentes en los terminales presinápticos, como canales de calcio voltaje dependiente y receptores GABA_B, producen una rápida reducción de la neurotransmisión, lo que contribuye a controlar los circuitos neuronales implicados en la ansiedad y el dolor. Estudios neurofisiológicos con foco en proteínas expresadas a nivel presináptico podrán ayudar a dilucidar la naturaleza de estos blancos moleculares en el futuro.

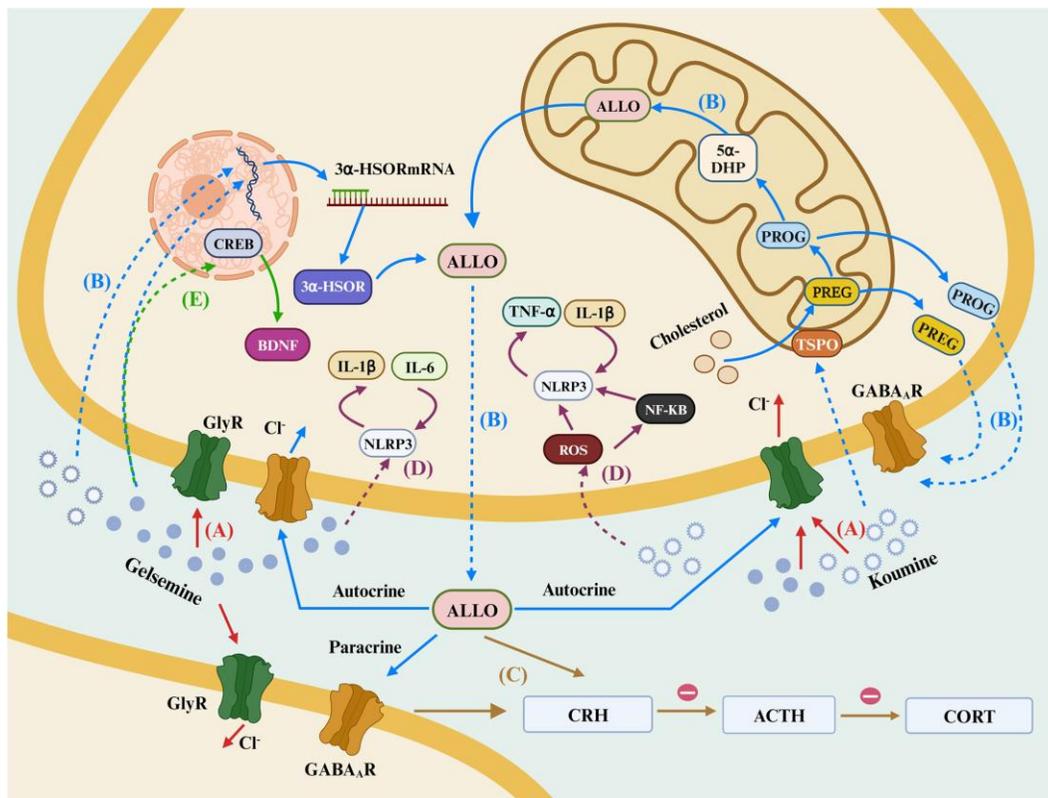


Figura 28. Modelo propuesto del mecanismo de acción asociado a alcaloides de la planta *Gelsemium*. En A. se propone que gelsemina y koumina, como agonistas para GlyR, reducen la excitabilidad neuronal mediante el influjo de Cl⁻. B. propone que gelsemina y koumina aumentan la expresión de 3α-HSOR y activan la TSPO promoviendo la producción de alopregnalona y finalmente esta activa a los

GABA_ARs reforzando la actividad inhibitoria. También se señalan que la producción de alopregnalona tiene otras acciones tales como en C. la consecuente disminución de los niveles de cortisol y D. propone que el efecto inhibitorio de koumina sobre los niveles de ROS, mediante la inhibición de la activación del inflammasoma NLRP3 y reducir la secreción TNF e IL-6. Y, por último, E. propone la reducción de proteínas como CREB y BDNF en el hipotálamo y el hipocampo mediada por gelsemina (Long et al., 2023)

En un contexto diferente al relacionado a las acciones benéficas de los alcaloides del *Gelsemium*, los resultados de este trabajo sumados a la evidencia previamente publicada (Lara et al., 2016), ofrecen un marco neurofisiológico racional y más directo para explicar la toxicidad intrínseca de gelsemina, koumina y gelsevirina. Como se mencionó anteriormente, la evidencia experimental indica que estos tres alcaloides son antagonistas competitivos de GlyR y GABA_AR, estableciendo un mecanismo de acción común con antagonistas competitivos reconocidos de esta clase de receptores: estricnina, picrotoxina y bicuculina (Zeilhofer et al., 2012; Olsen, 2015; Cerne et al., 2022). Estas similitudes sugieren que gelsemina, koumina y gelsevirina disminuyen la función glicinérgica y GABAérgica, generando una pérdida del control inhibitorio del SNC que coincide con una parte importante de la sintomatología de la intoxicación por alcaloides de *Gelsemium* (Jin et al., 2014). Por otra parte, nuestros resultados funcionales con humantenmina sugieren que su toxicidad no estaría relacionada con la modulación de GlyRs o GABA_ARs. Estudios *in vivo* han demostrado que la humantenmina es el alcaloide de *Gelsemium* de mayor potencia en términos toxicológicos, con valores

de LD₅₀ inferiores a 0.2 mg/kg en ratones (Lin et al., 2021). En ensayos similares, gelsemina y koumina han mostrado valores de LD₅₀ superiores a 50 mg/kg, indicando un mecanismo de acción diferente (Lin et al., 2021). Esta información sugiere que la toxicidad de los compuestos tipo gelsemina y tipo koumina probablemente esté relacionada con la inhibición de GlyRs o GABA_ARs, mientras que las acciones tóxicas de los alcaloides tipo gelsedina estarían mediadas por otros blancos moleculares (Figura 29). Estudios adicionales en este ámbito podrían proporcionar un marco racional para diseñar enfoques farmacológicos específicos para tratar la intoxicación aguda por *Gelsemium*. Este tipo de investigaciones toxicológicas son importantes en el contexto biomédico, especialmente considerando que las preparaciones de *Gelsemium* siguen siendo utilizadas en humanos y que artículos recientes han informado casos de intoxicaciones agudas por contaminación alimentaria o por consumo casual (Lin et al., 2021; Qu et al., 2021). A largo plazo, estudios de este tipo ayudarán a identificar y desarrollar antídotos seguros y más específicos contra la intoxicación aguda por diferentes alcaloides y preparaciones de *Gelsemium*.

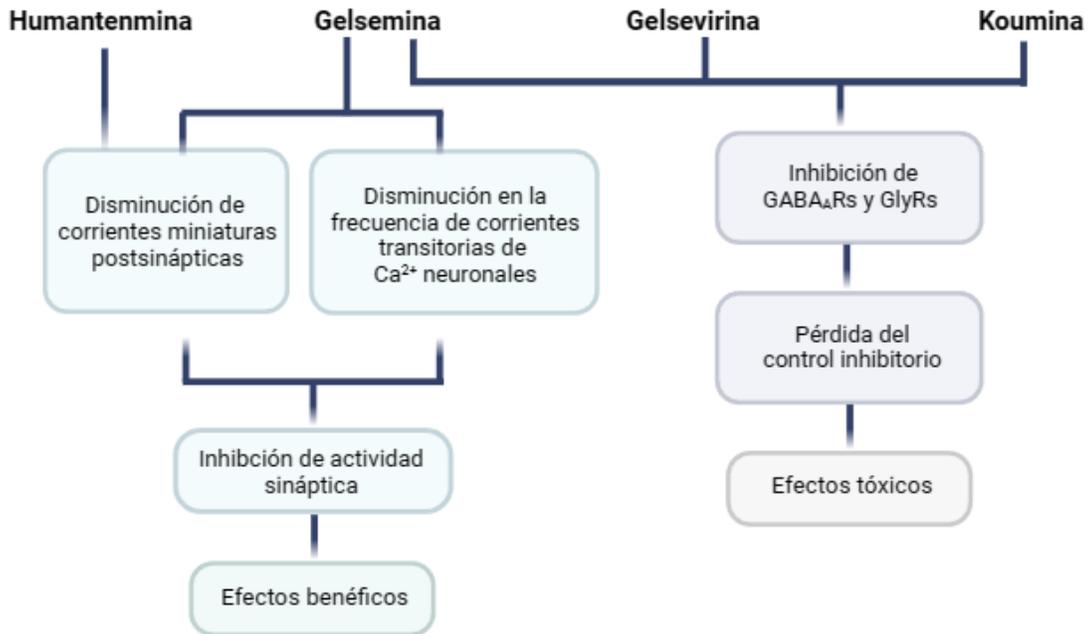


Figura 29. Asociación de acciones biológicas de los alcaloides de la planta *Gelsemium*, con posibles mecanismos de acción. El esquema relaciona las distintas acciones de los alcaloides de *Gelsemium* a nivel celular y sináptico con efectos benéficos y tóxicos en sistemas *in vivo*.

6. CONCLUSIONES.

En conjunto, los resultados de esta tesis proporcionan información novedosa sobre las acciones funcionales y los sitios moleculares de los alcaloides principales del *Gelsemium* en GABA_ARs y GlyRs. El perfil de actividad de gelsemina, koumina y gelsevirina en estos canales iónicos sugiere que estas interacciones pudieran estar asociados a sus efectos tóxicos. Por el contrario, los resultados encontrados con la humantemina sugieren que su actividad biológica estaría relacionada con otros blancos moleculares. Por otro lado, nuestros estudios enfocados en la sinapsis mostraron que gelsemina disminuyó la frecuencia de eventos GABAérgicos y glutamatérgicos, y a la vez, redujo la frecuencia de las señales espontáneas de calcio intracelular, sugiriendo un mecanismo de acción presináptico. Considerando evidencias previas y mecanismos de acción de fármacos de uso clínico, estas acciones presinápticas podrían proporcionar una hipótesis complementaria y novedosa para explicar los efectos beneficiosos de los alcaloides del *Gelsemium*. En resumen, los resultados de este trabajo contribuyen a definir las acciones biológicas y las características moleculares involucradas en la modulación de canales iónicos inhibitorios y de la sinapsis neuronal por alcaloides del *Gelsemium*. Estos hallazgos contribuyen a comprender, al menos en parte, los mecanismos involucrados en las acciones beneficiosas y tóxicas de los alcaloides del *Gelsemium* en mamíferos (Figura 29).

7. ANEXOS

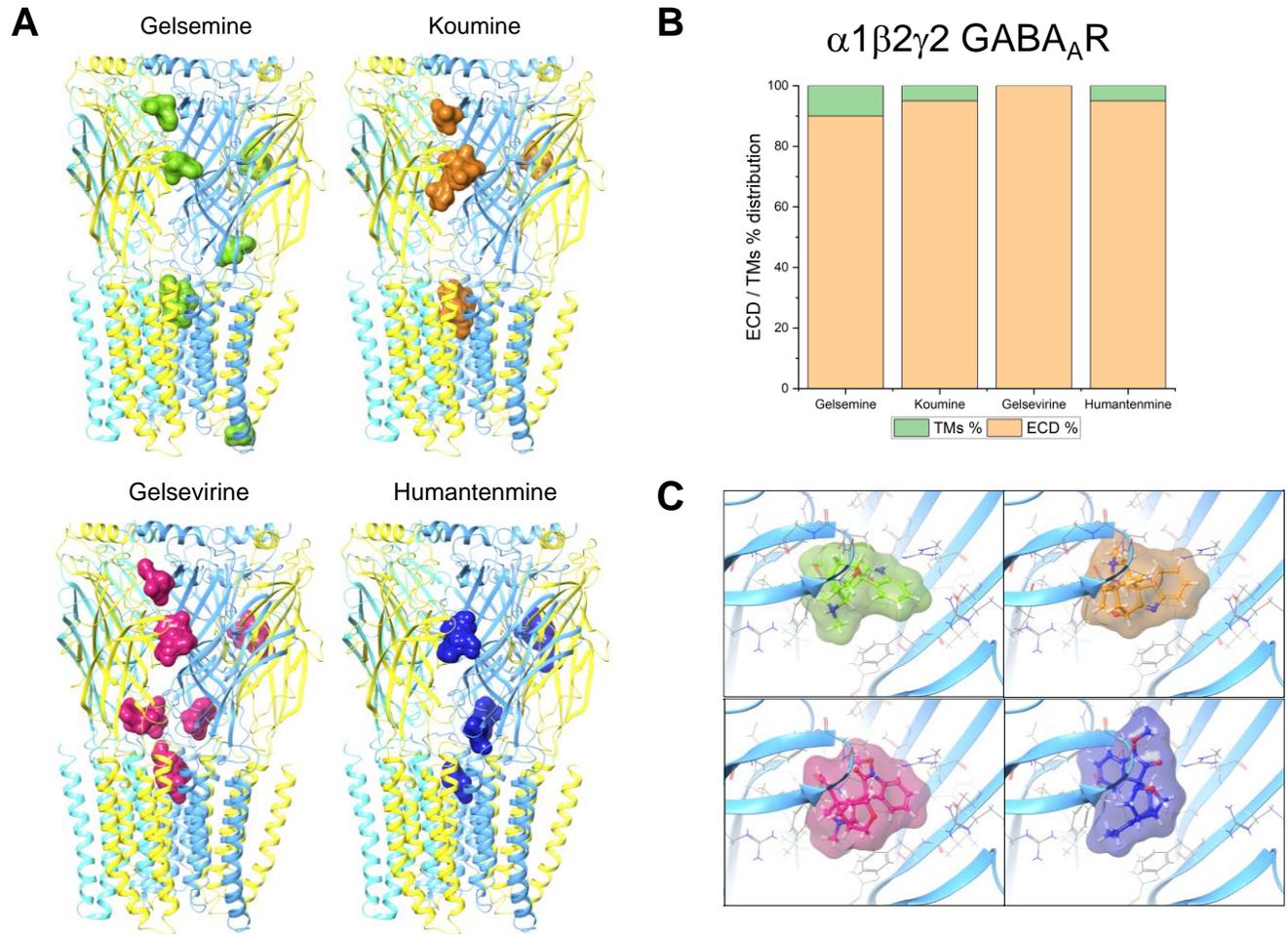


Figura 1. Sitios moleculares de alcaloides del *Gelsemium* en GABA_ARs.

A. Modelos estructurales de las interacciones putativas de gelsemina (verde), koumina (naranja), gelsevirina (rosa) y humantenmina (azul) con GABA_ARs de configuración $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Para este estudio se utilizó la estructura de $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_AR, 6X3S, obtenida del Protein Data Bank (PDB). Para los estudios de “*docking*” se utilizaron los programas Autodock Vina y GLIDE. **B.** El grafico resume los

porcentajes de complejos alcaloide-receptor formados en el dominio extracelular (ECD) y en los dominios transmembrana (TM). La mayoría de los complejos se situó en el ECD, con preferencia por el sitio ortostérico. **C.** Interacción de gelsemina (verde), koumina (naranja), gelsevirina (rosa) y humantenmina (azul) con el sitio ortostérico de $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_AR, localizado en la interfase entre las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$. Los valores de “*docking score*” fueron: gelsemina, -5.5 Kcal/mol; koumina, -5.5 Kcal/mol; gelsevirina, -5.5 Kcal/mol; humantenmina, -5.5 Kcal/mol. Los valores sugieren una interacción favorable entre los alcaloides y el receptor. Ensayos utilizando similares protocolos mostraron que interfase entre subunidades $\alpha 1$ y $\gamma 2$, la cual contiene el sitio de unión de las BDZ, no logró unir ninguno de los alcaloides de manera detectable, lo que impidió calcular un valor de “*docking score*”.

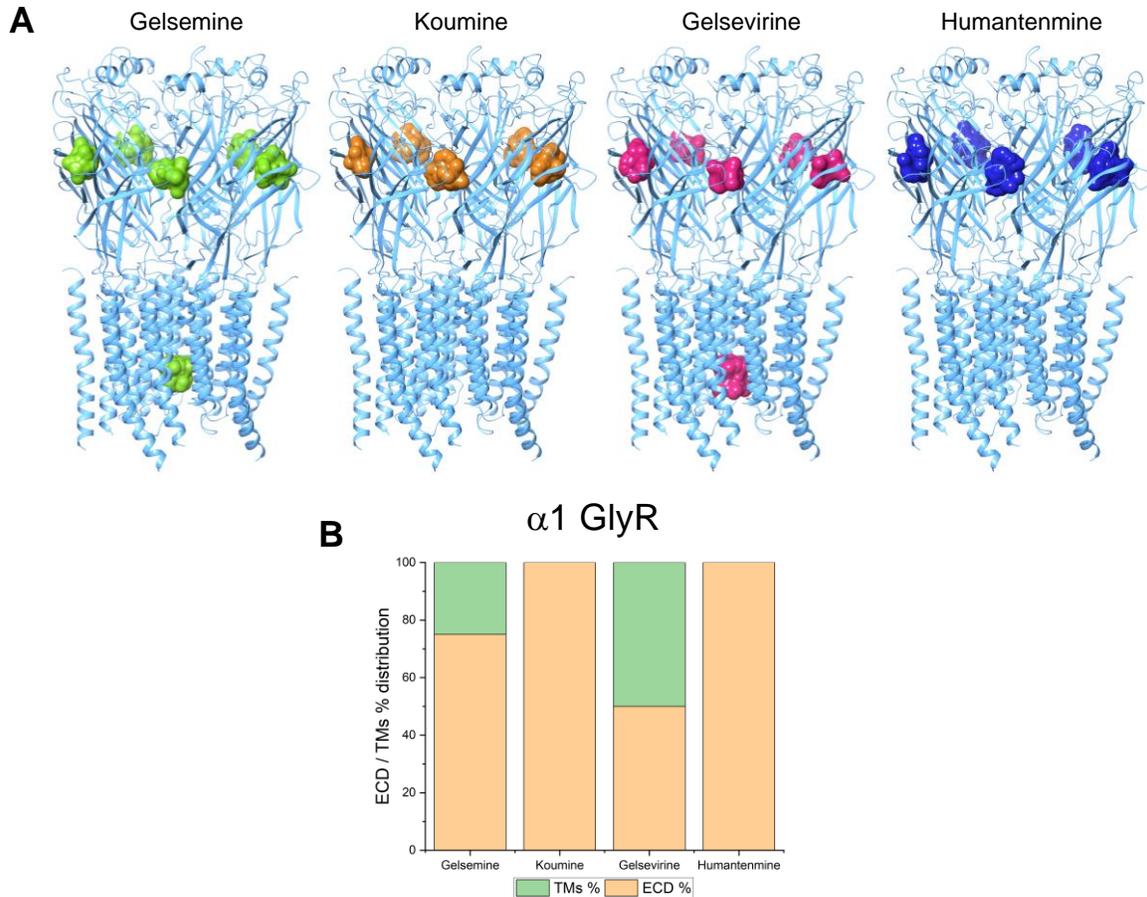


Figura 2. Sitios moleculares para gelsemina en GlyRs compuestos de la subunidad $\alpha 1$. **A.** Modelos estructurales de las interacciones putativas de gelsemina (verde), koumina (naranja), gelsevirina (rosa) y humantenmina (azul) con GlyRs de configuración $\alpha 1$. Para este estudio se utilizó la estructura de $\alpha 1$ GlyRs, 1TU9, obtenida del Protein Data Bank (PDB). Para el estudio de “*docking*” se utilizó el programa Autodock Vina. **B.** El grafico resume los porcentajes de complejos alcaloide-receptor formados en el dominio extracelular (ECD) y en los dominios transmembrana (TM). La mayoría de los complejos se situó en el ECD, con preferencia por el sitio ortostérico. Solo gelsemina y gelsevirina, ambos del grupo

de alcaloides del tipo gelsemina, mostraron formación de complejos alcaloide-receptor en los dominios de transmembrana del canal.

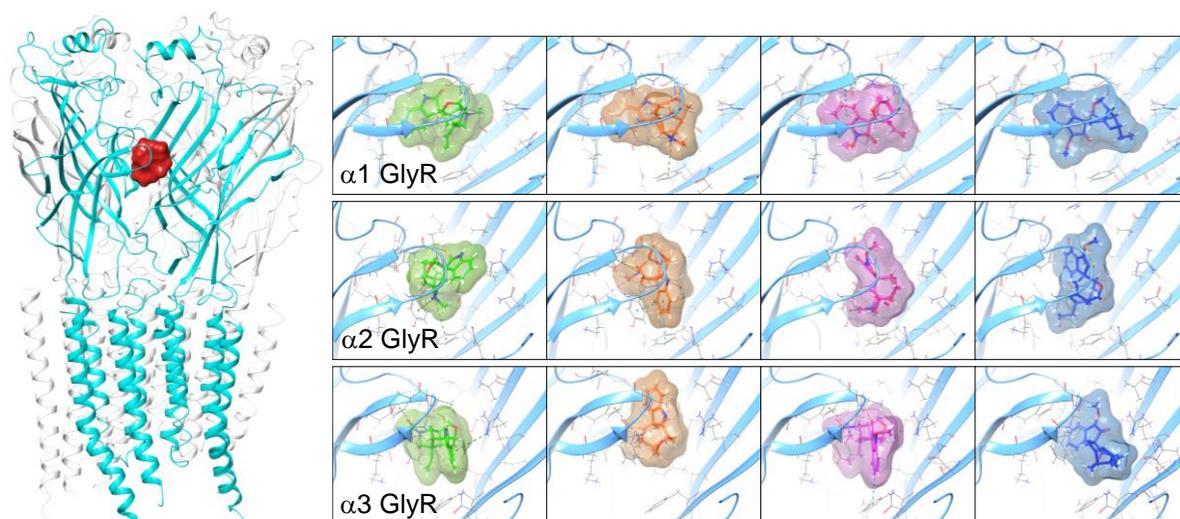


Figura 3. Interacciones de los alcaloides del *Gelsemium* con los sitios ortostéricos de GlyRs compuestos de la subunidad $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$. En el lado izquierdo, se muestra la interacción de gelsevirina con $\alpha 1$ GlyR (estructura 1TU9, PDB). A la derecha, se muestran modelos estructurales de las interacciones putativas de gelsemina (verde), koumina (naranja), gelsevirina (rosa) y humantenmina (azul) con los sitios ortostéricos de GlyRs de configuración $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$. Para este estudio se utilizaron las siguientes estructuras del Protein Data Bank (PDB): $\alpha 1$ GlyR (1TU9), $\alpha 2$ GlyR (1KUY), y $\alpha 3$ GlyR (5CFB). Para el estudio de “*docking*” se utilizó el programa GLIDE. Los valores promedio de “*docking score*” fueron: para $\alpha 1$ GlyR, gelsemina, -6.24 Kcal/mol; koumina, -6.59 Kcal/mol;

gelsevirina, -5.60 Kcal/mol; humantenmina, -5.3 Kcal/mol; para $\alpha 2$ GlyR, gelsemina, -6.37 Kcal/mol; koumina, -6.53 Kcal/mol; gelsevirina, -5.70 Kcal/mol; humantenmina, -5.8 Kcal/mol; para $\alpha 3$ GlyR, gelsemina, -6.51 Kcal/mol; koumina, -6.02 Kcal/mol; gelsevirina, -5.01 Kcal/mol; humantenmina, -3.77 Kcal/mol. Los valores sugieren una interacción probable entre los alcaloides y el receptor.

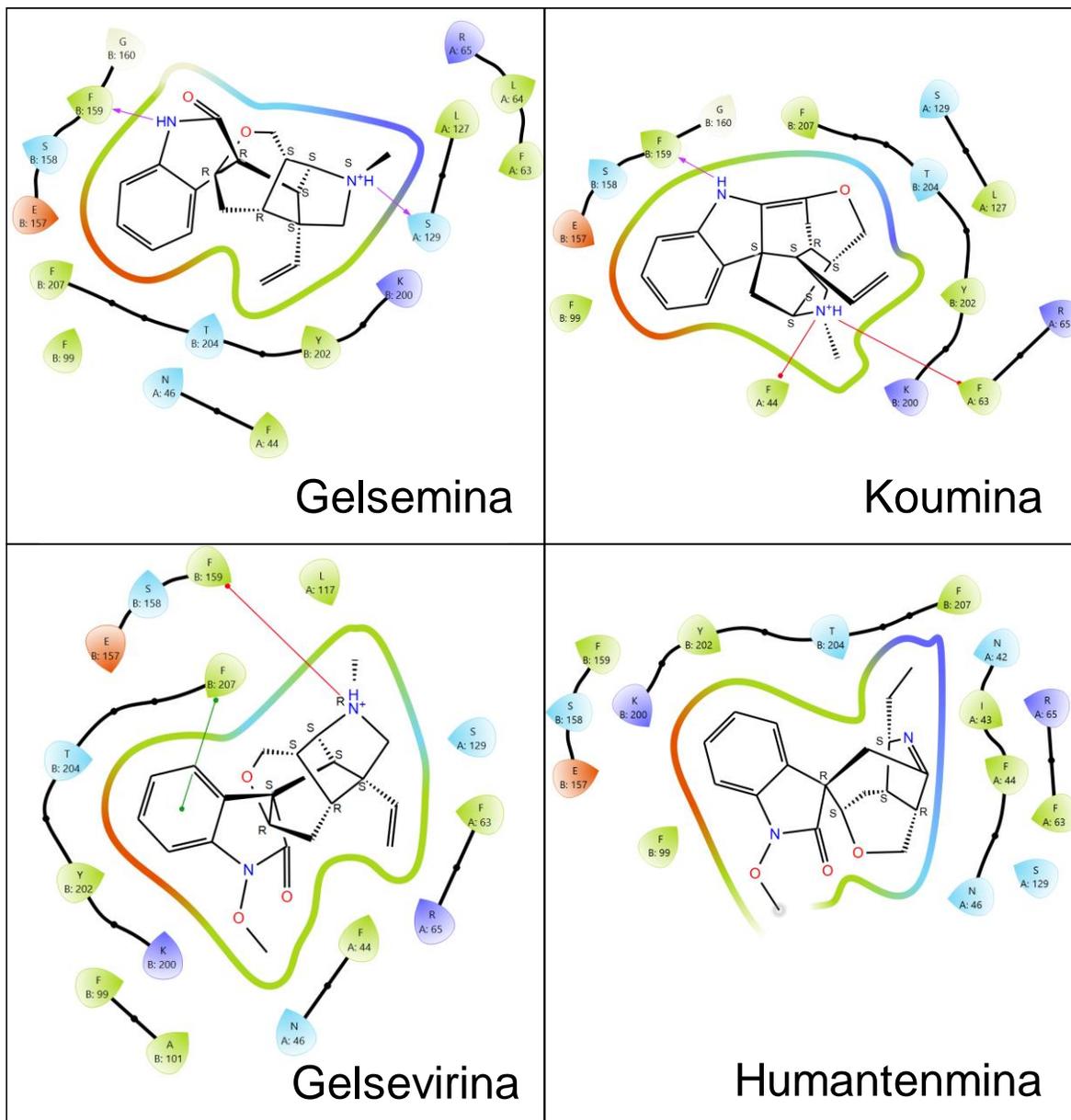


Figura 4. Interacciones de residuos del sitio ortostérico de GlyRs con alcaloides del *Gelsemium*. Los diagramas de interacción resumen la red de aminoácidos que estabilizan e interaccionan con los alcaloides del *Gelsemium* en el sitio ortostérico de $\alpha 1$ GlyR. Los residuos visualizados se encuentran a un máximo de 5Å de las moléculas. Aminoácidos de las cadenas A y B, las cuales corresponden a los ECDs de subunidades de subunidades $\alpha 1$ vecinas, participan estabilizando la

unión de los alcaloides. gelsemina, koumina y gelsevirina interaccionan a través de un nitrógeno cargado positivo con residuos específicos del sitio ortostérico. Humantenmina no mostró una estabilización significativa con ningún residuo específico.

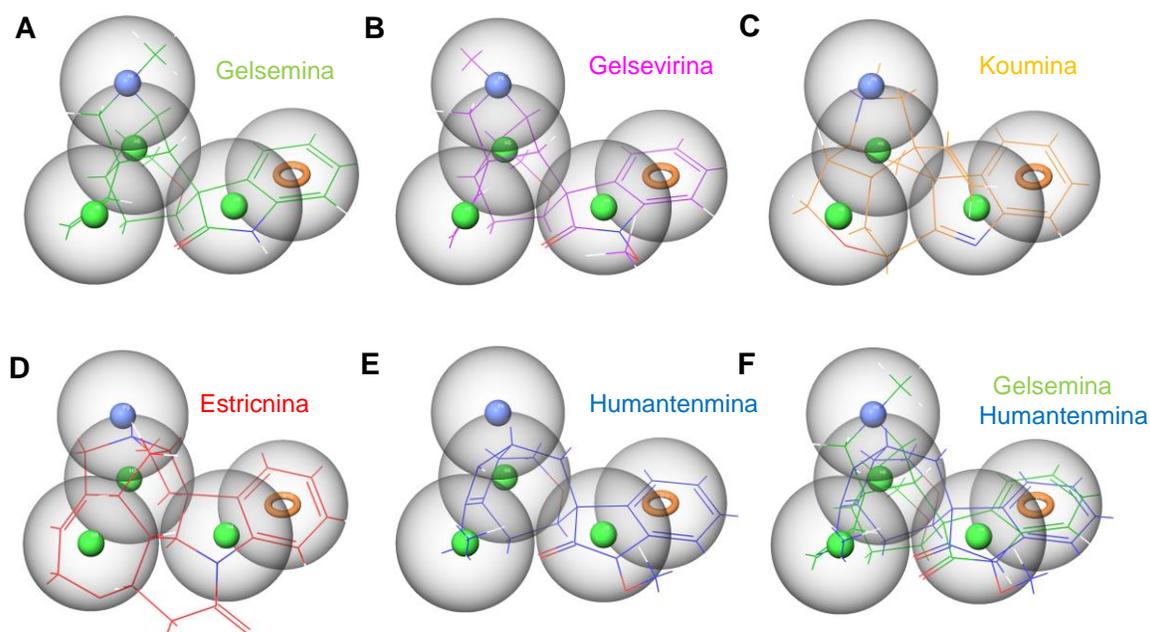


Figura 5. Farmacóforo propuesto para las acciones de alcaloides del *Gelsemium* sobre GlyRs. La figura muestra el farmacóforo construido en base a la información funcional de los alcaloides superpuesto con las estructuras químicas de gelsemina (**A**, verde), gelsevirina (**B**, rosa), koumina (**C**, dorado), estricina (**D**, rojo) y humantenmina (**E**, azul). El panel **F** muestra la superposición de gelsemina y humantenmina en el farmacóforo. Para este estudio se utilizó el programa Schrödinger. De acuerdo con las características del farmacóforo, los requerimientos estructurales para la acción funcional de los alcaloides (presencia de 3 grupos

hidrofóbicos, de un anillo aromático, y de un grupo nitrogenado cargado positivamente) solo son cumplidos por estriknina, gelsemina, koumina y gelsevirina. Humantenmina no muestra un grupo nitrogenado cargado positivamente, lo que explicaría la ausencia de modulación funcional en GlyRs.

Tabla 1. Efectos de la gelsemina sobre los receptores de glicina homoméricos y heteroméricos (GlyR) expresados en células HEK293. Extraído de Lara et al., 2016.

GlyR	EC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	n _H	Maximal modulation (%)	Maximal modulation concentration (μM)	n
α1	0.59 ± 0.02	–	4.68 ± 0.3	54.8 ± 13.5	10	12
α1β	–	N.C.	N.C.	–79.2 ± 3.8	300	13
α2	–	31.1 ± 3.8	1.17 ± 0.2	–94.5 ± 4.5	300	8
α2β	–	42.0 ± 3.7	1.58 ± 0.2	–87.0 ± 1.8	300	10
α3	–	36.7 ± 3.1	1.70 ± 0.2	–90.3 ± 3.2	300	12
α3β	–	49.2 ± 6.8	0.94 ± 0.1	–85.0 ± 9.8	300	8

Values are indicated as mean ± SEM. from the indicated number of cells. The EC₅₀ value of potentiation for α1glycine receptors was calculated from the concentration–response curve data points between 0.01 and 50 μM. The statistical analyses did not show significant differences between the values of gelsemine-induced inhibition of homomeric and heteromeric receptors composed of the α2 and α3 subunits. N.C. Not calculated.

9. BIBLIOGRAFIA.

Uncategorized References

- Absalom, N. L., Liao, V. W., & Chebib, M. (2020, Sep). Ligand-gated ion channels in genetic disorders and the question of efficacy. *Int J Biochem Cell Biol*, 126, 105806. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105806>
- Acuña, M. A., Yévenes, G. E., Ralvenius, W. T., Benke, D., Di Lio, A., Lara, C. O., Muñoz, B., Burgos, C. F., Moraga-Cid, G., Corringer, P. J., & Zeilhofer, H. U. (2016, Jul 1). Phosphorylation state-dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain. *J Clin Invest*, 126(7), 2547-2560. <https://doi.org/10.1172/jci83817>
- Aguayo, L. G., van Zundert, B., Tapia, J. C., Carrasco, M. A., & Alvarez, F. J. (2004, Dec). Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development. *Brain Res Brain Res Rev*, 47(1-3), 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.06.007>
- Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W. L., & Zeilhofer, H. U. (2002, Jan). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci*, 5(1), 34-40. <https://doi.org/10.1038/nn778>
- Alles, S. R. A., Cain, S. M., & Snutch, T. P. (2020). Pregabalin as a Pain Therapeutic: Beyond Calcium Channels. *Front Cell Neurosci*, 14, 83. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00083>
- Alvarez, F. J. (2017, Mar). Gephyrin and the regulation of synaptic strength and dynamics at glycinergic inhibitory synapses. *Brain Res Bull*, 129, 50-65. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.09.003>
- Alvarez, L. D., Pecci, A., & Estrin, D. A. (2019, Jun 13). In Search of GABA(A) Receptor's Neurosteroid Binding Sites. *J Med Chem*, 62(11), 5250-5260. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01400>
- Atak, S., Langlhofer, G., Schaefer, N., Kessler, D., Meiselbach, H., Delto, C., Schindelin, H., & Villmann, C. (2015). Disturbances of Ligand Potency and Enhanced Degradation of the Human Glycine Receptor at Affected Positions G160 and T162 Originally Identified in Patients Suffering from Hyperekplexia. *Front Mol Neurosci*, 8, 79. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00079>
- Avila, A., Vidal, P. M., Dear, T. N., Harvey, R. J., Rigo, J. M., & Nguyen, L. (2013, Aug 29). Glycine receptor $\alpha 2$ subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep*, 4(4), 738-750. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.016>

- Beato, M., Groot-Kormelink, P. J., Colquhoun, D., & Sivilotti, L. G. (2004, Jan 28). The activation mechanism of alpha1 homomeric glycine receptors. *J Neurosci*, 24(4), 895-906. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4420-03.2004>
- Becker, L., von Wegerer, J., Schenkel, J., Zeilhofer, H. U., Swandulla, D., & Weiher, H. (2002, Apr 1). Disease-specific human glycine receptor alpha1 subunit causes hyperekplexia phenotype and impaired glycine- and GABA(A)-receptor transmission in transgenic mice. *J Neurosci*, 22(7), 2505-2512. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-07-02505.2002>
- Belelli, D., Phillips, G. D., Atack, J. R., & Lambert, J. J. (2022, Feb). Relating neurosteroid modulation of inhibitory neurotransmission to behaviour. *J Neuroendocrinol*, 34(2), e13045. <https://doi.org/10.1111/jne.13045>
- Benson, J. A., Low, K., Keist, R., Mohler, H., & Rudolph, U. (1998, Jul 24). Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett*, 431(3), 400-404. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00803-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00803-5)
- Bode, A., & Lynch, J. W. (2014, Jan 9). The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain*, 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-2>
- Booker, S. A., Harada, H., Elgueta, C., Bank, J., Bartos, M., Kulik, A., & Vida, I. (2020, Feb 19). Presynaptic GABA(B) receptors functionally uncouple somatostatin interneurons from the active hippocampal network. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.51156>
- Botzolakis, E. J., Gurba, K. N., Lagrange, A. H., Feng, H. J., Stanic, A. K., Hu, N., & Macdonald, R. L. (2016, Sep 23). Comparison of γ -Aminobutyric Acid, Type A (GABAA), Receptor $\alpha\beta\gamma$ and $\alpha\beta\delta$ Expression Using Flow Cytometry and Electrophysiology: EVIDENCE FOR ALTERNATIVE SUBUNIT STOICHIOMETRIES AND ARRANGEMENTS. *J Biol Chem*, 291(39), 20440-20461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.698860>
- Bousta, D., Soulimani, R., Jarmouni, I., Belon, P., Falla, J., Froment, N., & Younos, C. (2001, Mar 3). Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and Poumon histamine in stressed mice. *J Ethnopharmacol*, 74(3), 205-215. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00346-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00346-9)
- Caraiscos, V. B., Elliott, E. M., You-Ten, K. E., Cheng, V. Y., Belelli, D., Newell, J. G., Jackson, M. F., Lambert, J. J., Rosahl, T. W., Wafford, K. A., MacDonald, J. F., & Orser, B. A. (2004, Mar 9). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), 3662-3667. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307231101>

- Centanni, S. W., Burnett, E. J., Trantham-Davidson, H., & Chandler, L. J. (2017, May). Loss of δ -GABA(A) receptor-mediated tonic currents in the adult prelimbic cortex following adolescent alcohol exposure. *Addict Biol*, 22(3), 616-628. <https://doi.org/10.1111/adb.12353>
- Cerne, R., Lippa, A., Poe, M. M., Smith, J. L., Jin, X., Ping, X., Golani, L. K., Cook, J. M., & Witkin, J. M. (2022, Jun). GABAkinase - Advances in the discovery, development, and commercialization of positive allosteric modulators of GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther*, 234, 108035. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108035>
- Chandra, D., Korpi, E. R., Miralles, C. P., De Blas, A. L., & Homanics, G. E. (2005, Apr 25). GABAA receptor gamma 2 subunit knockdown mice have enhanced anxiety-like behavior but unaltered hypnotic response to benzodiazepines. *BMC Neurosci*, 6, 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-30>
- Chattipakorn, S. C., & McMahon, L. L. (2002, Mar). Pharmacological characterization of glycine-gated chloride currents recorded in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*, 87(3), 1515-1525. <https://doi.org/10.1152/jn.00365.2001>
- Chen, C.-J., Zhong, Z.-F., Xin, Z.-M., Hong, L.-H., Su, Y.-P., & Yu, C.-X. (2017). Koumine exhibits anxiolytic properties without inducing adverse neurological effects on functional observation battery, open-field and Vogel conflict tests in rodents. *Journal of natural medicines*, 71(2), 397-408.
- Chen, J., Tsang, S. Y., Zhao, C. Y., Pun, F. W., Yu, Z., Mei, L., Lo, W. S., Fang, S., Liu, H., Stöber, G., & Xue, H. (2009, Dec). GABRB2 in schizophrenia and bipolar disorder: disease association, gene expression and clinical correlations. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 6), 1415-1418. <https://doi.org/10.1042/bst0371415>
- Chen, L., Pan, H., Bai, Y., Li, H., Yang, W., Lin, Z. X., Cui, W., & Xian, Y. F. (2020, Jul). Gelsemine, a natural alkaloid extracted from *Gelsemium elegans* Benth. alleviates neuroinflammation and cognitive impairments in A β oligomer-treated mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 237(7), 2111-2124. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05522-y>
- Choi, K. H., Nakamura, M., & Jang, I. S. (2013). Presynaptic glycine receptors increase GABAergic neurotransmission in rat periaqueductal gray neurons. *Neural Plast*, 2013, 954302. <https://doi.org/10.1155/2013/954302>
- Chua, H. C., & Chebib, M. (2017). GABA(A) Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. *Adv Pharmacol*, 79, 1-34. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.003>

- Cioffi, C. L. (2018, Apr 12). Modulation of Glycine-Mediated Spinal Neurotransmission for the Treatment of Chronic Pain. *J Med Chem*, 61(7), 2652-2679. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00956>
- Collinson, N., Kuenzi, F. M., Jarolimek, W., Maubach, K. A., Cothliff, R., Sur, C., Smith, A., Otu, F. M., Howell, O., Atack, J. R., McKernan, R. M., Seabrook, G. R., Dawson, G. R., Whiting, P. J., & Rosahl, T. W. (2002, Jul 1). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci*, 22(13), 5572-5580. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-13-05572.2002>
- Cornett, E. M., Rando, L., Labbé, A. M., Perkins, W., Kaye, A. M., Kaye, A. D., Viswanath, O., & Urits, I. (2021, Mar 16). Brexanolone to Treat Postpartum Depression in Adult Women. *Psychopharmacol Bull*, 51(2), 115-130.
- Corringer, P. J., Poitevin, F., Prevost, M. S., Sauguet, L., Delarue, M., & Changeux, J. P. (2012, Jun 6). Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain. *Structure*, 20(6), 941-956. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.003>
- Covey, D. F., Evers, A. S., Izumi, Y., Maguire, J. L., Mennerick, S. J., & Zorumski, C. F. (2023, Jun). Neurosteroid enantiomers as potentially novel neurotherapeutics. *Neurosci Biobehav Rev*, 149, 105191. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105191>
- Crestani, F., Lorez, M., Baer, K., Essrich, C., Benke, D., Laurent, J. P., Belzung, C., Fritschy, J. M., Lüscher, B., & Mohler, H. (1999, Sep). Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat Neurosci*, 2(9), 833-839. <https://doi.org/10.1038/12207>
- Crestani, F., Martin, J. R., Mohler, H., & Rudolph, U. (2000, Dec). Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo. *Br J Pharmacol*, 131(7), 1251-1254. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703717>
- Dalby, N. O., Falk-Petersen, C. B., Leurs, U., Scholze, P., Krall, J., Frølund, B., & Wellendorph, P. (2020, Sep). Silencing of spontaneous activity at $\alpha 4\beta 1/3\delta$ GABA(A) receptors in hippocampal granule cells reveals different ligand pharmacology. *Br J Pharmacol*, 177(17), 3975-3990. <https://doi.org/10.1111/bph.15146>
- de Bartolomeis, A., Manchia, M., Marmo, F., Vellucci, L., Iasevoli, F., & Barone, A. (2020). Glycine Signaling in the Framework of Dopamine-Glutamate Interaction and Postsynaptic Density. Implications for Treatment-Resistant Schizophrenia. *Front Psychiatry*, 11, 369. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00369>

- DeLorey, T. M., Handforth, A., Anagnostaras, S. G., Homanics, G. E., Minassian, B. A., Asatourian, A., Fanselow, M. S., Delgado-Escueta, A., Ellison, G. D., & Olsen, R. W. (1998, Oct 15). Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci*, *18*(20), 8505-8514. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-20-08505.1998>
- Doyon, N., Vinay, L., Prescott, S. A., & De Koninck, Y. (2016, Mar 16). Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition. *Neuron*, *89*(6), 1157-1172. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.030>
- Dutertre, S., Becker, C. M., & Betz, H. (2012, Nov 23). Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem*, *287*(48), 40216-40223. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.408229>
- Dutt, V., Dhar, V. J., & Sharma, A. (2010, Oct). Antianxiety activity of Gelsemium sempervirens. *Pharm Biol*, *48*(10), 1091-1096. <https://doi.org/10.3109/13880200903490521>
- Dutt, V., Thakur, S., Dhar, V. J., & Sharma, A. (2010, Jul). The genus Gelsemium: An update. *Pharmacogn Rev*, *4*(8), 185-194. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70916>
- Earnheart, J. C., Schweizer, C., Crestani, F., Iwasato, T., Itohara, S., Mohler, H., & Lüscher, B. (2007, Apr 4). GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J Neurosci*, *27*(14), 3845-3854. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3609-06.2007>
- El Matine, R., Kreutzmann, J. C., & Fendt, M. (2023, Jun 8). Chronic unilateral inhibition of GABA synthesis in the amygdala increases specificity of conditioned fear in a discriminative fear conditioning paradigm in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *124*, 110732. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110732>
- Farrant, M., & Nusser, Z. (2005, Mar). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*, *6*(3), 215-229. <https://doi.org/10.1038/nrn1625>
- Feng, M., Kong, D., Guo, H., Xing, C., Lv, J., Bian, H., Lv, N., Zhang, C., Chen, D., Liu, M., Yu, Y., & Su, L. (2022, Apr). Gelsevirine improves age-related and surgically induced osteoarthritis in mice by reducing STING availability and local inflammation. *Biochem Pharmacol*, *198*, 114975. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.114975>
- Ferguson, C., Hardy, S. L., Werner, D. F., Hileman, S. M., DeLorey, T. M., & Homanics, G. E. (2007, Oct 10). New insight into the role of the beta3 subunit of the GABAA-R in development, behavior, body weight regulation, and anesthesia revealed by conditional gene knockout. *BMC Neurosci*, *8*, 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-85>

- Fritschy, J. M. (2015). Significance of GABA(A) receptor heterogeneity: clues from developing neurons. *Adv Pharmacol*, 73, 13-39. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.11.006>
- Fritschy, J. M., & Mohler, H. (1995, Aug 14). GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*, 359(1), 154-194. <https://doi.org/10.1002/cne.903590111>
- Gallegos, S., Muñoz, B., Araya, A., & Aguayo, L. G. (2019, Dec 1). High ethanol sensitive glycine receptors regulate firing in D1 medium spiny neurons in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, 160, 107773. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107773>
- Gao, M., Zhang, H., Sun, Y., Gao, Z., Sun, C., Wei, F., & Gao, D. (2022, Oct 24). Gabrb2 knock-out mice exhibit double-directed PMDD-like symptoms: GABAAR subunits, neurotransmitter metabolism disruption, and allopregnanolone binding. *Aging (Albany NY)*, 14(20), 8437-8447. <https://doi.org/10.18632/aging.204351>
- Gavilan, J., Mennickent, D., Ramirez-Molina, O., Trivino, S., Perez, C., Silva-Grecchi, T., Godoy, P. A., Becerra, J., Aguayo, L. G., Moraga-Cid, G., Martin, V. S., Yevenes, G. E., Castro, P. A., Guzman, L., & Fuentealba, J. (2019). 17 Oxo Sparteine and Lupanine, Obtained from *Cytisus scoparius*, Exert a Neuroprotection against Soluble Oligomers of Amyloid-beta Toxicity by Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Alzheimers Dis*, 67(1), 343-356. <https://doi.org/10.3233/jad-180945>
- Ghanem, S. S., Fayed, H. S., Zhu, Q., Lu, J. H., Vaikath, N. N., Ponraj, J., Mansour, S., & El-Agnaf, O. M. A. (2021, Jun 19). Natural Alkaloid Compounds as Inhibitors for Alpha-Synuclein Seeded Fibril Formation and Toxicity. *Molecules*, 26(12). <https://doi.org/10.3390/molecules26123736>
- Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S., & Hussein, D. E. E. (2021, Aug 21). GABA(A) receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *J Genet Eng Biotechnol*, 19(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0>
- Glykys, J., Mann, E. O., & Mody, I. (2008, Feb 6). Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci*, 28(6), 1421-1426. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4751-07.2008>
- González-Ramírez, M., Gavilán, J., Silva-Grecchi, T., Cajas-Madriaga, D., Triviño, S., Becerra, J., Saez-Orellana, F., Pérez, C., & Fuentealba, J. (2018). A Natural Benzofuran from the Patagonic *Aleurodiscus vitellinus* Fungus has Potent Neuroprotective Properties on a Cellular Model of Amyloid- β Peptide Toxicity. *J Alzheimers Dis*, 61(4), 1463-1475. <https://doi.org/10.3233/jad-170958>

- Govindpani, K., Calvo-Flores Guzmán, B., Vinnakota, C., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., & Kwakowsky, A. (2017). Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1813. <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1813>
- Groemer, T. W., Triller, A., Zeilhofer, H. U., Becker, K., Eulenburg, V., & Becker, C. M. (2022). Nociception in the Glycine Receptor Deficient Mutant Mouse Spastic. *Front Mol Neurosci*, 15, 832490. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.832490>
- Groeneweg, F. L., Trattinig, C., Kuhse, J., Nawrotzki, R. A., & Kirsch, J. (2018, Nov). Gephyrin: a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond. *Histochem Cell Biol*, 150(5), 489-508. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1725-2>
- Groot-Kormelink, P. J., Beato, M., Finotti, C., Harvey, R. J., & Sivilotti, L. G. (2002, Jan 30). Achieving optimal expression for single channel recording: a plasmid ratio approach to the expression of alpha 1 glycine receptors in HEK293 cells. *J Neurosci Methods*, 113(2), 207-214. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(01\)00500-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(01)00500-3)
- Gui-lin, J., Hai-ping, L., Ya-xin, H., Qing-quan, Z., Jin-xing, C., Xiao-bing, L., Zhi-ming, X., Bojun, X., Rong-cai, Y., & Chang-xi, Y. (2022). Koumine regulates macrophage M1/M2 polarization via TSP0, alleviating sepsis-associated liver injury in mice. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154484>
- Günther, U., Benson, J., Benke, D., Fritschy, J. M., Reyes, G., Knoflach, F., Crestani, F., Aguzzi, A., Arigoni, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Mohler, H., & Lüscher, B. (1995, Aug 15). Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17), 7749-7753. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7749>
- Hammond, C. (2015). Chapter 9 - The ionotropic GABAA receptor. In C. Hammond (Ed.), *Cellular and Molecular Neurophysiology (Fourth Edition)* (pp. 199-219). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397032-9.00009-1>
- Hammond, C., & Esclapez, M. (2015). Chapter 6 - The chemical synapses. In C. Hammond (Ed.), *Cellular and Molecular Neurophysiology (Fourth Edition)* (pp. 121-144). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397032-9.00006-6>
- Hammond, C., & Michel, F. (2015). Chapter 5 - The voltage-gated channels of Ca²⁺ action potentials: Generalization. In C. Hammond (Ed.), *Cellular and Molecular Neurophysiology (Fourth Edition)* (pp. 93-120). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397032-9.00005-4>

- Hannan, S., Minere, M., Harris, J., Izquierdo, P., Thomas, P., Tench, B., & Smart, T. G. (2020, Jun 1). GABA(A)R isoform and subunit structural motifs determine synaptic and extrasynaptic receptor localisation. *Neuropharmacology*, *169*, 107540. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.022>
- Hannan, S., & Smart, T. G. (2018, Aug 31). Cell surface expression of homomeric GABA(A) receptors depends on single residues in subunit transmembrane domains. *J Biol Chem*, *293*(35), 13427-13439. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002792>
- Harvey, R. J. (2019, Oct). Hijacking of GABA(A) Receptors by Mutant Glycine Receptors. *Trends Mol Med*, *25*(10), 823-825. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.08.010>
- Harvey, R. J., Depner, U. B., Wässle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O. M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D. P., Betz, H., Zeilhofer, H. U., & Müller, U. (2004, May 7). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*, *304*(5672), 884-887. <https://doi.org/10.1126/science.1094925>
- Harvey, R. J., & Yee, B. K. (2013, 2013/11/01). Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(11), 866-885. <https://doi.org/10.1038/nrd3893>
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M., & Smart, T. G. (2006, Nov 23). Endogenous neurosteroids regulate GABA(A) receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, *444*(7118), 486-489. <https://doi.org/10.1038/nature05324>
- Huang, J., Su, Y., Yu, C., Xu, Y., & Yang, J. (2010). Cytotoxic effects of alkaloidal compounds from *Gelsemium elegans* Benth on the tumor cells of digestive system in vitro. *Strait Pharm. J*, *22*, 197-200.
- Huang, S. J., Zuo, M. T., Qi, X. J., Huang, C. Y., & Liu, Z. Y. (2021, Oct). Phosphoproteomics reveals NMDA receptor-mediated excitotoxicity as a key signaling pathway in the toxicity of gelsenicine. *Food Chem Toxicol*, *156*, 112507. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112507>
- Huang, X., Chen, H., Michelsen, K., Schneider, S., & Shaffer, P. L. (2015, Oct 8). Crystal structure of human glycine receptor- α 3 bound to antagonist strychnine. *Nature*, *526*(7572), 277-280. <https://doi.org/10.1038/nature14972>
- Huang, X., Shaffer, P. L., Ayube, S., Bregman, H., Chen, H., Lehto, S. G., Luther, J. A., Matson, D. J., McDonough, S. I., Michelsen, K., Plant, M. H., Schneider, S., Simard, J. R., Teffera, Y., Yi, S., Zhang, M., DiMauro, E. F., & Gingras, J. (2017, Feb). Crystal structures of human glycine

- receptor $\alpha 3$ bound to a novel class of analgesic potentiators. *Nat Struct Mol Biol*, 24(2), 108-113. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3329>
- Iqbal, S., Han, J., Matorin, A., Husnain, A., Ullah, U., Naeem, R., & Shah, A. A. (2023). Schizophrenia and Chronic Psychotic Disorders: Update on Treatment Options and New Trends. *Psychiatric Annals*, 53(4), 155-159. <https://doi.org/doi:10.3928/00485713-20230313-02>
- Jacob, T. C. (2019). Neurobiology and Therapeutic Potential of $\alpha 5$ -GABA Type A Receptors. *Front Mol Neurosci*, 12, 179. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00179>
- Jahangir, M., Zhou, J. S., Lang, B., & Wang, X. P. (2021). GABAergic System Dysfunction and Challenges in Schizophrenia Research. *Front Cell Dev Biol*, 9, 663854. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.663854>
- Jang, I. S., Nakamura, M., Ito, Y., & Akaike, N. (2006). Presynaptic GABA_A receptors facilitate spontaneous glutamate release from presynaptic terminals on mechanically dissociated rat CA3 pyramidal neurons. *Neuroscience*, 138(1), 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.001>
- Jin, G. L., He, S. D., Lin, S. M., Hong, L. M., Chen, W. Q., Xu, Y., Yang, J., Li, S. P., & Yu, C. X. (2018a). Koumine Attenuates Neuroglia Activation and Inflammatory Response to Neuropathic Pain. *Neural Plast*, 2018, 9347696. <https://doi.org/10.1155/2018/9347696>
- Jin, G. L., He, S. D., Lin, S. M., Hong, L. M., Chen, W. Q., Xu, Y., Yang, J., Li, S. P., & Yu, C. X. (2018b). Koumine Attenuates Neuroglia Activation and Inflammatory Response to Neuropathic Pain. 2018, 9347696. <https://doi.org/10.1155/2018/9347696>
- Jin, G. L., Liu, H. P., Huang, Y. X., Zeng, Q. Q., Chen, J. X., Lan, X. B., Xin, Z. M., Xiong, B. J., Yue, R. C., & Yu, C. X. (2022, Dec). Koumine regulates macrophage M1/M2 polarization via TSPO, alleviating sepsis-associated liver injury in mice. *Phytomedicine*, 107, 154484. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154484>
- Jin, G. L., Su, Y. P., Liu, M., Xu, Y., Yang, J., Liao, K. J., & Yu, C. X. (2014, Feb 27). Medicinal plants of the genus *Gelsemium* (Gelsemiaceae, Gentianales)--a review of their phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use. *J Ethnopharmacol*, 152(1), 33-52. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.003>
- Jin, G. L., Yue, R. C., He, S. D., Hong, L. M., Xu, Y., & Yu, C. X. (2018). Koumine Decreases Astrocyte-Mediated Neuroinflammation and Enhances Autophagy, Contributing to Neuropathic Pain From Chronic Constriction Injury in Rats. *Front Pharmacol*, 9, 989. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00989>

- Jin, X. T., Galvan, A., Wichmann, T., & Smith, Y. (2011). Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. *Front Syst Neurosci*, 5, 63. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00063>
- Kandel, E. R., Schwartz, James H., Jessell, Thomas M. (2000). *PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE*. McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Kang, J. Q., & Barnes, G. (2013, Jan). A common susceptibility factor of both autism and epilepsy: functional deficiency of GABA A receptors. *J Autism Dev Disord*, 43(1), 68-79. <https://doi.org/10.1007/s10803-012-1543-7>
- Kasaragod, V. B., Malinauskas, T., Wahid, A. A., Lengyel, J., Knoflach, F., Hardwick, S. W., Jones, C. F., Chen, W.-N., Lucas, X., El Omari, K., Chirgadze, D. Y., Aricescu, A. R., Cecere, G., Hernandez, M.-C., & Miller, P. S. (2023, 2023/12/01). The molecular basis of drug selectivity for $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors. *Nature Structural & Molecular Biology*, 30(12), 1936-1946. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01133-1>
- Khuong-Huu, F., Chiaroni, A., & Riche, C. (1981, 1981/01/01/). Structure of koumine, an alkaloid from gelsemium elegans benth. *Tetrahedron Letters*, 22(8), 733-734. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4039\(81\)80136-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4039(81)80136-0)
- Kim, J. J., & Hibbs, R. E. (2021, Jun). Direct Structural Insights into GABA(A) Receptor Pharmacology. *Trends Biochem Sci*, 46(6), 502-517. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.011>
- Kling, C., Koch, M., Saul, B., & Becker, C. M. (1997, May). The frameshift mutation oscillator (Gla1(sp-d-ot)) produces a complete loss of glycine receptor alpha1-polypeptide in mouse central nervous system. *Neuroscience*, 78(2), 411-417. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00567-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00567-2)
- Knoflach, F., & Bertrand, D. (2021, Aug). Pharmacological modulation of GABA(A) receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 59, 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.04.003>
- Krashia, P., Lape, R., Lodesani, F., Colquhoun, D., & Sivilotti, L. G. (2011, Feb). The long activations of $\alpha 2$ glycine channels can be described by a mechanism with reaction intermediates ("flip"). *J Gen Physiol*, 137(2), 197-216. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010521>
- Kumar, A., Basak, S., Rao, S., Gicheru, Y., Mayer, M. L., Sansom, M. S. P., & Chakrapani, S. (2020, Jul 27). Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in lipid nanodiscs. *Nat Commun*, 11(1), 3752. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17364-5>
- Laboute, T., Zucca, S., Holcomb, M., Patil, D. N., Garza, C., Wheatley, B. A., Roy, R. N., Forli, S., & Martemyanov, K. A. (2023, Mar 31). Orphan receptor GPR158 serves as a metabotropic

glycine receptor: mGlyR. *Science*, 379(6639), 1352-1358.
<https://doi.org/10.1126/science.add7150>

Lai, C. K., & Chan, Y. W. (2009, Jan-Feb). Confirmation of gelsemium poisoning by targeted analysis of toxic gelsemium alkaloids in urine. *J Anal Toxicol*, 33(1), 56-61.
<https://doi.org/10.1093/jat/33.1.56>

Lara, C. O., Burgos, C. F., Moraga-Cid, G., Carrasco, M. A., & Yévenes, G. E. (2020). Pentameric Ligand-Gated Ion Channels as Pharmacological Targets Against Chronic Pain. *Front Pharmacol*, 11, 167. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00167>

Lara, C. O., Murath, P., Munoz, B., Marileo, A. M., Martin, L. S., San Martin, V. P., Burgos, C. F., Mariqueo, T. A., Aguayo, L. G., Fuentealba, J., Godoy, P., Guzman, L., & Yevenes, G. E. (2016, Jul). Functional modulation of glycine receptors by the alkaloid gelsemine. *Br J Pharmacol*, 173(14), 2263-2277. <https://doi.org/10.1111/bph.13507>

Lasoń, W., Chlebicka, M., & Rejdak, K. (2013). Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep*, 65(4), 787-801.
[https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71060-0](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71060-0)

Lemoine, D., Jiang, R., Taly, A., Chataigneau, T., Specht, A., & Grutter, T. (2012, Dec 12). Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition. *Chem Rev*, 112(12), 6285-6318. <https://doi.org/10.1021/cr3000829>

Li, Y. J., Yang, K., Long, X. M., Xiao, G., Huang, S. J., Zeng, Z. Y., Liu, Z. Y., & Sun, Z. L. (2022, Jan-Dec). Toxicity assessment of gelsenicine and the search for effective antidotes. *Hum Exp Toxicol*, 41, 9603271211062857. <https://doi.org/10.1177/09603271211062857>

Lin, H., Qiu, H., Cheng, Y., Liu, M., Chen, M., Que, Y., & Que, W. (2021, Nov 25). Gelsemium elegans Benth: Chemical Components, Pharmacological Effects, and Toxicity Mechanisms. *Molecules*, 26(23). <https://doi.org/10.3390/molecules26237145>

Lin, L., Liu, Y. C., & Liu, Z. Y. (2019, May 25). The Difference in Cytotoxic Activity between Two Optical Isomers of Gelsemine from Gelsemium elegans Benth. on PC12 Cells. *Molecules*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24102004>

Lin, L., Zheng, J., Zhu, W., & Jia, N. (2015, Mar). Nephroprotective effect of gelsemine against cisplatin-induced toxicity is mediated via attenuation of oxidative stress. *Cell Biochem Biophys*, 71(2), 535-541. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0231-y>

- Lin, Y., Liu, Q., Chen, Z., Zheng, F., Huang, H., Yu, C., & Yang, J. (2022, Jan 5). The immunomodulatory effect of koumine on B cells under dependent and independent responses by T cells. *Eur J Pharmacol*, 914, 174690. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174690>
- Lin, Y. R., Zheng, F. T., Xiong, B. J., Chen, Z. H., Chen, S. T., Fang, C. N., Yu, C. X., & Yang, J. (2023, Jul 15). Koumine alleviates rheumatoid arthritis by regulating macrophage polarization. *J Ethnopharmacol*, 311, 116474. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116474>
- Ling, Q., Liu, M., Wu, M. X., Xu, Y., Yang, J., Huang, H. H., & Yu, C. X. (2014). Anti-allodynic and neuroprotective effects of koumine, a Benth alkaloid, in a rat model of diabetic neuropathy. *Biol Pharm Bull*, 37(5), 858-864. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00843>
- Linnemann, C., Schmeh, I., Thier, P., & Schwarz, C. (2006, Jul 27). Transient change in GABA(A) receptor subunit mRNA expression in Lurcher cerebellar nuclei during Purkinje cell degeneration. *BMC Neurosci*, 7, 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-59>
- LinZhong, T. (1988). Analgesic Effect and No Physical Dependence of Gelsemiumelegans Benth [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 1.
- Liu, M., Huang, H. H., Yang, J., Su, Y. P., Lin, H. W., Lin, L. Q., Liao, W. J., & Yu, C. X. (2013, Feb). The active alkaloids of Gelsemium elegans Benth. are potent anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)*, 225(4), 839-851. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2867-x>
- Liu, M., Shen, J., Liu, H., Xu, Y., Su, Y.-P., Yang, J., & Yu, C.-X. (2011). Gelsenicine from Gelsemium elegans attenuates neuropathic and inflammatory pain in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(12), 1877-1880.
- Liu, Y. C., Lin, L., Cheng, P., Sun, Z. L., Wu, Y., & Liu, Z. Y. (2017, Sep). Fingerprint analysis of Gelsemium elegans by HPLC followed by the targeted identification of chemical constituents using HPLC coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Fitoterapia*, 121, 94-105. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.07.002>
- Long, J., Tang, M., Zuo, M., Xu, W., Meng, S., & Liu, Z. (2023). The antianxiety effects of koumine and gelsemine, two main active components in the traditional Chinese herbal medicine Gelsemium: A comprehensive review. *Brain-X*, 1(4), e46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/brx2.46>
- Löw, K., Crestani, F., Keist, R., Benke, D., Brünig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Rüllicke, T., Bluethmann, H., Möhler, H., & Rudolph, U. (2000, Oct 6). Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*, 290(5489), 131-134. <https://doi.org/10.1126/science.290.5489.131>

- Lu, J. S., Yang, L., Chen, J., Xiong, F. F., Cai, P., Wang, X. Y., Xiong, B. J., Chen, Z. H., Chen, L., Yang, J., & Yu, C. X. (2023, May). Basolateral amygdala astrocytes modulate diabetic neuropathic pain and may be a potential therapeutic target for koumine. *Br J Pharmacol*, *180*(10), 1408-1428. <https://doi.org/10.1111/bph.16011>
- Lüscher, B., & Möhler, H. (2019). Brexanolone, a neurosteroid antidepressant, vindicates the GABAergic deficit hypothesis of depression and may foster resilience. *F1000Res*, *8*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18758.1>
- Luscher, B., Shen, Q., & Sahir, N. (2011, Apr). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry*, *16*(4), 383-406. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.120>
- Lynch, J. W. (2009, Jan). Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, *56*(1), 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.034>
- Magnani, P., Conforti, A., Zanolin, E., Marzotto, M., & Bellavite, P. (2010, Jul). Dose-effect study of Gelsemium sempervirens in high dilutions on anxiety-related responses in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *210*(4), 533-545. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1855-2>
- Malosio, M. L., Marquèze-Pouey, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1991, Sep). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *Embo j*, *10*(9), 2401-2409. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07779.x>
- Manzke, T., Niebert, M., Koch, U. R., Caley, A., Vogelgesang, S., Hülsmann, S., Ponimaskin, E., Müller, U., Smart, T. G., Harvey, R. J., & Richter, D. W. (2010, Nov). Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor $\alpha 3$ controls breathing in mice. *J Clin Invest*, *120*(11), 4118-4128. <https://doi.org/10.1172/jci43029>
- Marabelli, A., Moroni, M., Lape, R., & Sivilotti, L. G. (2013, Jul 1). The kinetic properties of the $\alpha 3$ rat glycine receptor make it suitable for mediating fast synaptic inhibition. *J Physiol*, *591*(13), 3289-3308. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.252189>
- Marileo, A. M., Gavilán, J., San Martín, V. P., Lara, C. O., Sazo, A., Muñoz-Montesino, C., Castro, P. A., Burgos, C. F., Leiva-Salcedo, E., Aguayo, L. G., Moraga-Cid, G., Fuentealba, J., & Yévenes, G. E. (2022). Modulation of GABA(A) receptors and of GABAergic synapses by the natural alkaloid gelsemine. *Front Mol Neurosci*, *15*, 1083189. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1083189>
- Marowsky, A., & Vogt, K. E. (2014). Delta-subunit-containing GABAA-receptors mediate tonic inhibition in paracapsular cells of the mouse amygdala. *Front Neural Circuits*, *8*, 27. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00027>

- Marzotto, M., Olioso, D., Brizzi, M., Tononi, P., Cristofolletti, M., & Bellavite, P. (2014, Mar 19). Extreme sensitivity of gene expression in human SH-SY5Y neurocytes to ultra-low doses of Gelsemium sempervirens. *BMC Complement Altern Med*, 14, 104. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-104>
- Mastrangelo, M. (2021, Jan). Epilepsy in inherited neurotransmitter disorders: Spotlights on pathophysiology and clinical management. *Metab Brain Dis*, 36(1), 29-43. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00635-x>
- Maynard, S. A., Rostaing, P., Schaefer, N., Gemin, O., Candat, A., Dumoulin, A., Villmann, C., Triller, A., & Specht, C. G. (2021, Dec 8). Identification of a stereotypic molecular arrangement of endogenous glycine receptors at spinal cord synapses. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.74441>
- McCool, B. A., Frye, G. D., Pulido, M. D., & Botting, S. K. (2003, Feb 14). Effects of chronic ethanol consumption on rat GABA(A) and strychnine-sensitive glycine receptors expressed by lateral/basolateral amygdala neurons. *Brain Res*, 963(1-2), 165-177. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03966-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03966-5)
- McCracken, L. M., Lowes, D. C., Salling, M. C., Carreau-Vollmer, C., Odean, N. N., Blednov, Y. A., Betz, H., Harris, R. A., & Harrison, N. L. (2017, Aug 22). Glycine receptor $\alpha 3$ and $\alpha 2$ subunits mediate tonic and exogenous agonist-induced currents in forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(34), E7179-e7186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703839114>
- Mellon, S. H. (2007, Oct). Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther*, 116(1), 107-124. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.011>
- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., & Langosch, D. (1995, Sep). Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron*, 15(3), 563-572. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90145-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90145-0)
- Meyer, L., Boujedaini, N., Patte-Mensah, C., & Mensah-Nyagan, A. G. (2013, Sep 15). Pharmacological effect of gelsemine on anxiety-like behavior in rat. *Behav Brain Res*, 253, 90-94. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.010>
- Mihalek, R. M., Banerjee, P. K., Korpi, E. R., Quinlan, J. J., Firestone, L. L., Mi, Z. P., Lagenaur, C., Tretter, V., Sieghart, W., Anagnostaras, S. G., Sage, J. R., Fanselow, M. S., Guidotti, A., Spigelman, I., Li, Z., DeLorey, T. M., Olsen, R. W., & Homanics, G. E. (1999, Oct 26). Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), 12905-12910. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12905>

- Mohler, H. (2009, Dec). Role of GABAA receptors in cognition. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 6), 1328-1333. <https://doi.org/10.1042/bst0371328>
- Möhler, H. (2012, Jan). The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 62(1), 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.040>
- Möhler, H., Fritschy, J., & Rudolph, U. (2002). A new benzodiazepine pharmacology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1), 2-8.
- Möhler, H., Rudolph, U., Boison, D., Singer, P., Feldon, J., & Yee, B. K. (2008, 2008/07/01/). Regulation of cognition and symptoms of psychosis: Focus on GABAA receptors and glycine transporter 1. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(1), 58-64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.03.003>
- Montandon, G., Wu, H., Liu, H., Vu, M. T., Orser, B. A., & Horner, R. L. (2017, Dec 22). δ -Subunit Containing GABA(A) Receptors Modulate Respiratory Networks. *Sci Rep*, 7(1), 18105. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17379-x>
- Moraga-Cid, G., Sauguet, L., Huon, C., Malherbe, L., Girard-Blanc, C., Petres, S., Murail, S., Taly, A., Baaden, M., Delarue, M., & Corringer, P. J. (2015, Mar 3). Allosteric and hyperekplexic mutant phenotypes investigated on an $\alpha 1$ glycine receptor transmembrane structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(9), 2865-2870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417864112>
- Moraga-Cid, G., Yevenes, G. E., Schmalzing, G., Peoples, R. W., & Aguayo, L. G. (2011, Sep). A Single phenylalanine residue in the main intracellular loop of alpha1 gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors influences their sensitivity to propofol. *Anesthesiology*, 115(3), 464-473. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31822550f7>
- Morelli, G., Avila, A., Ravanidis, S., Aourz, N., Neve, R. L., Smolders, I., Harvey, R. J., Rigo, J. M., Nguyen, L., & Brône, B. (2017, Mar 1). Cerebral Cortical Circuitry Formation Requires Functional Glycine Receptors. *Cereb Cortex*, 27(3), 1863-1877. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw025>
- Muñoz, B., Gallegos, S., Peters, C., Murath, P., Lovinger, D. M., Homanics, G. E., & Aguayo, L. G. (2020, Mar). Influence of nonsynaptic $\alpha 1$ glycine receptors on ethanol consumption and place preference. *Addict Biol*, 25(2), e12726. <https://doi.org/10.1111/adb.12726>
- Muñoz, B., Mariqueo, T., Murath, P., Peters, C., Yevenes, G. E., Moraga-Cid, G., Peoples, R. W., & Aguayo, L. G. (2021). Modulatory Actions of the Glycine Receptor β Subunit on the Positive Allosteric Modulation of Ethanol in $\alpha 2$ Containing Receptors. *Front Mol Neurosci*, 14, 763868. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.763868>

- Muñoz, B., Yevenes, G. E., Förstera, B., Lovinger, D. M., & Aguayo, L. G. (2018). Presence of Inhibitory Glycinergic Transmission in Medium Spiny Neurons in the Nucleus Accumbens. *Front Mol Neurosci*, 11, 228. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00228>
- Nemecz, Á., Prevost, M. S., Menny, A., & Corringer, P. J. (2016, May 4). Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron*, 90(3), 452-470. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.032>
- Nusser, Z., Sieghart, W., & Somogyi, P. (1998, Mar 1). Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci*, 18(5), 1693-1703. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-05-01693.1998>
- Nys, M., Kesters, D., & Ulens, C. (2013, Oct 15). Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem Pharmacol*, 86(8), 1042-1053. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.001>
- Olsen, R. W., Lindemeyer, A. K., Wallner, M., Li, X., Huynh, K. W., & Zhou, Z. H. (2019, Jul). Cryo-electron microscopy reveals informative details of GABA(A) receptor structural pharmacology: implications for drug discovery. *Ann Transl Med*, 7(Suppl 3), S144. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.06.23>
- Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2009, Jan). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.045>
- Pedroni, L., Dorne, J., Dall'Asta, C., & Dellafiora, L. (2023, Sep 6). An in silico insight on the mechanistic aspects of gelsenicine toxicity: a reverse screening study pointing to the possible involvement of acetylcholine binding receptor. *Toxicol Lett*. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.09.003>
- Peng, Y. L., Liang, J. J., Xue, Y., Khan, A., Zhang, P. P., Feng, T. T., Song, D., Zhou, Y., & Wei, X. (2023, Aug 25). Genus Gelsemium and its endophytic fungi - Comprehensive review of their traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Curr Top Med Chem*. <https://doi.org/10.2174/1568026623666230825105233>
- Perlis, R. H., Purcell, S., Fagerness, J., Kirby, A., Petryshen, T. L., Fan, J., & Sklar, P. (2008, Jan). Family-based association study of lithium-related and other candidate genes in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 65(1), 53-61. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.15>
- Pernía-Andrade, A. J., Kato, A., Witschi, R., Nyilas, R., Katona, I., Freund, T. F., Watanabe, M., Filitz, J., Koppert, W., Schüttler, J., Ji, G., Neugebauer, V., Marsicano, G., Lutz, B., Vanegas, H., & Zeilhofer, H. U. (2009, Aug 7). Spinal endocannabinoids and CB1 receptors mediate C-fiber-

- induced heterosynaptic pain sensitization. *Science*, 325(5941), 760-764. <https://doi.org/10.1126/science.1171870>
- Pilorge, M., Fassier, C., Le Corrond, H., Potey, A., Bai, J., De Gois, S., Delaby, E., Assouline, B., Guinchat, V., Devillard, F., Delorme, R., Nygren, G., Råstam, M., Meier, J. C., Otani, S., Cheval, H., James, V. M., Topf, M., Dear, T. N., Gillberg, C., Leboyer, M., Giros, B., Gautron, S., Hazan, J., Harvey, R. J., Legendre, P., & Betancur, C. (2016, Jul). Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Mol Psychiatry*, 21(7), 936-945. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.139>
- Piro, I., Eckes, A. L., Kasaragod, V. B., Sommer, C., Harvey, R. J., Schaefer, N., & Villmann, C. (2021). Novel Functional Properties of Missense Mutations in the Glycine Receptor β Subunit in Startle Disease. *Front Mol Neurosci*, 14, 745275. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.745275>
- Planells-Cases, R., & Jentsch, T. J. (2009, Mar). Chloride channelopathies. *Biochim Biophys Acta*, 1792(3), 173-189. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.002>
- Qiu, H. Q., Xu, Y., Jin, G. L., Yang, J., Liu, M., Li, S. P., & Yu, C. X. (2015, Aug 9). Koumine enhances spinal cord 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase expression and activity in a rat model of neuropathic pain. *Mol Pain*, 11, 46. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0050-1>
- Qu, D., Qiao, D. F., Chen, X. C., Feng, C. Q., Luo, Q. Z., & Tan, X. H. (2021, Apr). Fatal poisoning by accidental ingestion of the "heartbreak grass" (*Gelsemium elegans*) verified by toxicological and medico-legal analyses. *Forensic Sci Int*, 321, 110745. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110745>
- Que, W., Lin, H., Li, X., Zhang, B., Liu, M., Hu, X., Fu, J., Cheng, Y., & Qiu, H. (2023, Jan). Koumine ameliorates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice: involvement of the Nrf2, NF- κ B pathways, and gut microbiota. *Int Immunopharmacol*, 114, 109573. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109573>
- Que, W., Wu, Z., Chen, M., Zhang, B., You, C., Lin, H., Zhao, Z., Liu, M., Qiu, H., & Cheng, Y. (2021). Molecular Mechanism of *Gelsemium elegans* (Gardner and Champ.) Benth. Against Neuropathic Pain Based on Network Pharmacology and Experimental Evidence. *Front Pharmacol*, 12, 792932. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.792932>
- Ralvenius, W. T., Benke, D., Acuña, M. A., Rudolph, U., & Zeilhofer, H. U. (2015, Apr 13). Analgesia and unwanted benzodiazepine effects in point-mutated mice expressing only one benzodiazepine-sensitive GABAA receptor subtype. *Nat Commun*, 6, 6803. <https://doi.org/10.1038/ncomms7803>

- Rana Muhammad, S., Jing-Yang, Z., Jing-Yang, Z., Xiao-Fang, M., Yong-Xiang, W., Yong-Xiang, W., & Yong-Xiang, W. (2019). Gelsemine and koumine, principal active ingredients of Gelsemium, exhibit mechanical antiallodynia via spinal glycine receptor activation-induced allopregnanolone biosynthesis. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.014>
- Reddy, D. S. (2010). Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res*, 186, 113-137. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53630-3.00008-7>
- Ren, Z., Sahir, N., Murakami, S., Luellen, B. A., Earnheart, J. C., Lal, R., Kim, J. Y., Song, H., & Luscher, B. (2015, Jan). Defects in dendrite and spine maturation and synaptogenesis associated with an anxious-depressive-like phenotype of GABAA receptor-deficient mice. *Neuropharmacology*, 88, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.07.019>
- Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brunig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Martin, J. R., Bluethmann, H., & Mohler, H. (1999, Oct 21). Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*, 401(6755), 796-800. <https://doi.org/10.1038/44579>
- Rudolph, U., & Mohler, H. (2004). Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 475-498. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121429>
- Rudolph, U., & Möhler, H. (2004). Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 475-498. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121429>
- Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., & Panthong, A. (2003, Nov). Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from Gelsemium elegans Benth. *J Ethnopharmacol*, 89(1), 91-95. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00267-8](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00267-8)
- Sakimoto, Y., Oo, P. M., Goshima, M., Kanehisa, I., Tsukada, Y., & Mitsushima, D. (2021, Nov 18). Significance of GABA(A) Receptor for Cognitive Function and Hippocampal Pathology. *Int J Mol Sci*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212456>
- Sallard, E., Letourneur, D., & Legendre, P. (2021, Jul). Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. *Cell Mol Life Sci*, 78(13), 5341-5370. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03846-2>

- Schaefer, N., Langlhofer, G., Kluck, C. J., & Villmann, C. (2013, Nov). Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia. *Br J Pharmacol*, *170*(5), 933-952. <https://doi.org/10.1111/bph.12335>
- Schicker, K. W., Dorostkar, M. M., & Boehm, S. (2008, Jun). Modulation of transmitter release via presynaptic ligand-gated ion channels. *Curr Mol Pharmacol*, *1*(2), 106-129. <https://doi.org/10.2174/1874467210801020106>
- Schweizer, C., Balsiger, S., Bluethmann, H., Mansuy, I. M., Fritschy, J. M., Mohler, H., & Lüscher, B. (2003, Oct). The gamma 2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Mol Cell Neurosci*, *24*(2), 442-450. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00202-1)
- Shimizu-Okabe, C., Kobayashi, S., Kim, J., Kosaka, Y., Sunagawa, M., Okabe, A., & Takayama, C. (2022, Jan 13). Developmental Formation of the GABAergic and Glycinergic Networks in the Mouse Spinal Cord. *Int J Mol Sci*, *23*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020834>
- Shoib, R. M., Zhang, J. Y., Mao, X. F., & Wang, Y. X. (2019, Mar). Gelsemine and koumine, principal active ingredients of Gelsemium, exhibit mechanical antiallodynia via spinal glycine receptor activation-induced allopregnanolone biosynthesis. *Biochem Pharmacol*, *161*, 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.014>
- Sieghart, W. (2015). Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol*, *72*, 53-96. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.10.002>
- Sperk, G., Schwarzer, C., Tsunashima, K., Fuchs, K., & Sieghart, W. (1997, Oct). GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience*, *80*(4), 987-1000. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00146-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00146-2)
- Spigelman, I., Li, Z., Banerjee, P. K., Mihalek, R. M., Homanics, G. E., & Olsen, R. W. (2002). Behavior and physiology of mice lacking the GABAA-receptor delta subunit. *Epilepsia*, *43 Suppl 5*, 3-8. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.43.s.5.8.x>
- Stell, B. M., Brickley, S. G., Tang, C. Y., Farrant, M., & Mody, I. (2003, Nov 25). Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(24), 14439-14444. <https://doi.org/10.1073/pnas.2435457100>
- Sun, M., Hou, X., Gao, H., Guo, J., & Xiao, K. (2013, Jan 31). Two new koumine-type indole alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. *Molecules*, *18*(2), 1819-1825. <https://doi.org/10.3390/molecules18021819>

- Sun, M. Y., Shu, H. J., Benz, A., Bracamontes, J., Akk, G., Zorumski, C. F., Steinbach, J. H., & Mennerick, S. J. (2018, Sep 19). Chemogenetic Isolation Reveals Synaptic Contribution of δ GABA(A) Receptors in Mouse Dentate Granule Neurons. *J Neurosci*, *38*(38), 8128-8145. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0799-18.2018>
- Sun, Y., Blanco-Centurion, C., Bendell, E., Vidal-Ortiz, A., Luo, S., & Liu, M. (2019, Aug 14). Activity dynamics of amygdala GABAergic neurons during cataplexy of narcolepsy. *Elife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.48311>
- Sun, Y., Peng, Z., Wei, X., Zhang, N., Huang, C. S., Wallner, M., Mody, I., & Houser, C. R. (2022, Nov). Virally-induced expression of GABA(A) receptor δ subunits following their pathological loss reveals their role in regulating GABA(A) receptor assembly. *Prog Neurobiol*, *218*, 102337. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102337>
- Sur, C., Wafford, K. A., Reynolds, D. S., Hadingham, K. L., Bromidge, F., Macaulay, A., Collinson, N., O'Meara, G., Howell, O., Newman, R., Myers, J., Atack, J. R., Dawson, G. R., McKernan, R. M., Whiting, P. J., & Rosahl, T. W. (2001, May 15). Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J Neurosci*, *21*(10), 3409-3418. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-10-03409.2001>
- Szemes, M., Davies, R. L., Garden, C. L., & Usowicz, M. M. (2013, Jul 19). Weaker control of the electrical properties of cerebellar granule cells by tonically active GABAA receptors in the Ts65Dn mouse model of Down's syndrome. *Mol Brain*, *6*, 33. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-33>
- Tan, J., Qiu, C., & Zheng, L. (1988). Analgesic effect and no physical dependence of Gelsemium elegans Benth. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, *4*(1), 24-28.
- Tapia, J. C., & Aguayo, L. G. (1998, Mar). Changes in the properties of developing glycine receptors in cultured mouse spinal neurons. *Synapse*, *28*(3), 185-194. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2396\(199803\)28:3<185::aid-syn1>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2396(199803)28:3<185::aid-syn1>3.0.co;2-6)
- Taylor, C. P., Angelotti, T., & Fauman, E. (2007, Feb). Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel α 2-delta (α 2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res*, *73*(2), 137-150. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.09.008>
- Tijssen, M. A., Schoemaker, H. C., Edelbroek, P. J., Roos, R. A., Cohen, A. F., & van Dijk, J. G. (1997, Jul). The effects of clonazepam and vigabatrin in hyperekplexia. *J Neurol Sci*, *149*(1), 63-67. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(97\)05378-1](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(97)05378-1)

- Tyagarajan, S. K., & Fritschy, J. M. (2014, Mar). Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat Rev Neurosci*, *15*(3), 141-156. <https://doi.org/10.1038/nrn3670>
- Tziridis, K., Buerbank, S., Eulenburg, V., Dlugaiczyk, J., & Schulze, H. (2017, Feb). Deficit in acoustic signal-in-noise detection in glycine receptor $\alpha 3$ subunit knockout mice. *Eur J Neurosci*, *45*(4), 581-586. <https://doi.org/10.1111/ejn.13489>
- Ullah, A., Long, X., Mat, W.-K., Hu, T., Khan, M. I., Hui, L., Zhang, X., Sun, P., Gao, M., Wang, J., Wang, H., Li, X., Sun, W., Qiao, M., & Xue, H. (2020, 2020-June-30). Highly Recurrent Copy Number Variations in GABRB2 Associated With Schizophrenia and Premenstrual Dysphoric Disorder [Original Research]. *Frontiers in Psychiatry*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00572>
- Venard, C., Boujedaini, N., Belon, P., Mensah-Nyagan, A., & Patte-Mensah, C. (2008). Regulation of neurosteroid allopregnanolone biosynthesis in the rat spinal cord by glycine and the alkaloidal analogs strychnine and gelsemine. *Neuroscience*, *153*(1), 154-161.
- Vitet, L., Patte-Mensah, C., Boujedaini, N., Mensah-Nyagan, A. G., & Meyer, L. (2018, Dec). Beneficial effects of Gelsemium-based treatment against paclitaxel-induced painful symptoms. *Neuro Sci*, *39*(12), 2183-2196. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3575-z>
- Vuilleumier, P. H., Fritsche, R., Schliessbach, J., Schmitt, B., Arendt-Nielsen, L., Zeilhofer, H. U., & Curatolo, M. (2018, Jan 1). Mutations affecting glycinergic neurotransmission in hyperekplexia increase pain sensitivity. *Brain*, *141*(1), 63-71. <https://doi.org/10.1093/brain/awx289>
- Wei, W., Zhang, N., Peng, Z., Houser, C. R., & Mody, I. (2003, Nov 19). Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, *23*(33), 10650-10661. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-33-10650.2003>
- Werynska, K., Gingras, J., Benke, D., Scheurer, L., Neumann, E., & Zeilhofer, H. U. (2021, Sep 1). A Glra3 phosphodeficient mouse mutant establishes the critical role of protein kinase A-dependent phosphorylation and inhibition of glycine receptors in spinal inflammatory hyperalgesia. *Pain*, *162*(9), 2436-2445. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002236>
- Wieland, H. A., Lüddens, H., & Seeburg, P. H. (1992, Jan 25). A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem*, *267*(3), 1426-1429.
- Wu, D., Qin, R., Cai, J., & Chi, D. (2006). Antitumor activity of koumine in vitro and vivo. *Pharmacol. Clin. Chin. Mater. Med*, *22*, 6-8.

- Wu, J., Zhao, M., Jin, Y. C., Li, M., Yu, K. X., & Yu, H. B. (2023, Nov 28). Schisandrin B, a dual positive allosteric modulator of GABA(A) and glycine receptors, alleviates seizures in multiple mouse models. *Acta Pharmacol Sin.* <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01195-3>
- Wu, T., Chen, G., Chen, X., Wang, Q., & Wang, G. (2015, Jan). Anti-hyperlipidemic and anti-oxidative effects of gelsemine in high-fat-diet-fed rabbits. *Cell Biochem Biophys*, *71*(1), 337-344. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0203-2>
- Wu, Y. E., Li, Y. D., Luo, Y. J., Wang, T. X., Wang, H. J., Chen, S. N., Qu, W. M., & Huang, Z. L. (2015, Nov). Gelsemine alleviates both neuropathic pain and sleep disturbance in partial sciatic nerve ligation mice. *Acta Pharmacol Sin*, *36*(11), 1308-1317. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.86>
- Wu, Z., Parry, M., Hou, X. Y., Liu, M. H., Wang, H., Cain, R., Pei, Z. F., Chen, Y. C., Guo, Z. Y., Abhijeet, S., & Chen, G. (2020, Feb 27). Gene therapy conversion of striatal astrocytes into GABAergic neurons in mouse models of Huntington's disease. *Nat Commun*, *11*(1), 1105. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14855-3>
- Wu, Z. S., Cheng, H., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2015, Aug). Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, *36*(8), 895-907. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.66>
- Xing, C., Lv, J., Zhu, Z., Cong, W., Bian, H., Zhang, C., Gu, R., Chen, D., Tan, X., Su, L., & Zhang, Y. (2023). Regulation of microglia related neuroinflammation contributes to the protective effect of Gelsevirine on ischemic stroke. *Front Immunol*, *14*, 1164278. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1164278>
- Xing, H., Cui, N., Johnson, C. M., Faisthalab, Z., & Jiang, C. (2021, May). Dual synaptic inhibitions of brainstem neurons by GABA and glycine with impact on Rett syndrome. *J Cell Physiol*, *236*(5), 3615-3628. <https://doi.org/10.1002/jcp.30098>
- Xiong, B., Jin, G., Xu, Y., You, W., Luo, Y., Fang, M., Chen, B., Huang, H., Yang, J., Lin, X., & Yu, C. (2021). Identification of Koumine as a Translocator Protein 18 kDa Positive Allosteric Modulator for the Treatment of Inflammatory and Neuropathic Pain. *Front Pharmacol*, *12*, 692917. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.692917>
- Xiong, B., You, W., Luo, Y., Jin, G., Wu, M., Xu, Y., Yang, J., Huang, H., & Yu, C. (2021). Investigation of the Possible Allostery of Koumine Extracted From *Gelsemium elegans* Benth. And Analgesic Mechanism Associated With Neurosteroids. *Front Pharmacol*, *12*, 739618. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.739618>

- Xiong, B., Zhong, Z., Chen, C., Huang, H., Lin, J., Xu, Y., Yang, J., & Yu, C. (2022, Aug). The anxiolytic effect of koumine on a predatory sound stress-induced anxiety model and its associated molecular mechanisms. *Phytomedicine*, 103, 154225. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154225>
- Xiong, B. J., Xu, Y., Jin, G. L., Liu, M., Yang, J., & Yu, C. X. (2017, Oct 27). Analgesic effects and pharmacologic mechanisms of the Gelsemium alkaloid koumine on a rat model of postoperative pain. *Sci Rep*, 7(1), 14269. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14714-0>
- Xu, T. L., & Gong, N. (2010, Aug). Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: diversity, function and regulation. *Prog Neurobiol*, 91(4), 349-361. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.008>
- Xu, W. B., Tang, M. H., Long, J. Y., Wang, W. W., Qin, J. Y., Qi, X. J., & Liu, Z. Y. (2023, Nov 12). Antinociceptive effect of gelsenicine, principal toxic alkaloids of gelsemium, on prostaglandin E2-induced hyperalgesia in mice: Comparison with gelsemine and koumine. *Biochem Biophys Res Commun*, 681, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.09.037>
- Xu, Y., Qiu, H.-Q., Liu, H., Liu, M., Huang, Z.-Y., Yang, J., Su, Y.-P., & Yu, C.-X. (2012). Effects of koumine, an alkaloid of *Gelsemium elegans* Benth., on inflammatory and neuropathic pain models and possible mechanism with allopregnanolone. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 101(3), 504-514.
- Xu, Y. K., Liao, S. G., Na, Z., Hu, H. B., Li, Y., & Luo, H. R. (2012, Sep). Gelsemium alkaloids, immunosuppressive agents from *Gelsemium elegans*. *Fitoterapia*, 83(6), 1120-1124. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.04.023>
- Yang, A. C., & Tsai, S.-J. (2017). New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1689. <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1689>
- Yang, J., Cai, H. D., Zeng, Y. L., Chen, Z. H., Fang, M. H., Su, Y. P., Huang, H. H., Xu, Y., & Yu, C. X. (2016, Oct 28). Effects of Koumine on Adjuvant- and Collagen-Induced Arthritis in Rats. *J Nat Prod*, 79(10), 2635-2643. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00554>
- Yang, J., Lin, Y. R., Xiong, B. J., Chen, Z. H., Luo, Y. F., Xu, Y., Su, Y. P., Huang, H. H., & Yu, C. X. (2022, Dec 15). Regulation effect of koumine on T-helper cell polarization in rheumatoid arthritis. *Eur J Pharmacol*, 937, 175387. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175387>
- Yang, S., Liu, Y., Sun, F., Zhang, J., Jin, Y., Li, Y., Zhou, J., Li, Y., & Zhu, K. (2020, Jan 5). Gelsedine-type alkaloids: Discovery of natural neurotoxins presented in toxic honey. *J Hazard Mater*, 381, 120999. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120999>

- Ye, Q., Feng, Y., Wang, Z., Jiang, W., Qu, Y., Zhang, C., Zhou, A., Xie, S., & Zou, J. (2018). Effects of gelsemine on oxidative stress and DNA damage responses of *Tetrahymena thermophila*. *PeerJ*, 6, e6093. <https://doi.org/10.7717/peerj.6093>
- Yeo, M., Zhang, Q., Ding, L., Shen, X., Chen, Y., & Liedtke, W. (2022). Spinal cord dorsal horn sensory gate in preclinical models of chemotherapy-induced painful neuropathy and contact dermatitis chronic itch becomes less leaky with *Kcc2* gene expression-enhancing treatments. *Front Mol Neurosci*, 15, 911606. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.911606>
- Yevenes, G. E., Moraga-Cid, G., Avila, A., Guzman, L., Figueroa, M., Peoples, R. W., & Aguayo, L. G. (2010, Sep 24). Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gbetagamma modulation. *J Biol Chem*, 285(39), 30203-30213. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134676>
- Yevenes, G. E., Peoples, R. W., Tapia, J. C., Parodi, J., Soto, X., Olate, J., & Aguayo, L. G. (2003). Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature neuroscience*, 6(8), 819.
- Young-Pearse, T. L., Ivic, L., Kriegstein, A. R., & Cepko, C. L. (2006, Aug). Characterization of mice with targeted deletion of glycine receptor alpha 2. *Mol Cell Biol*, 26(15), 5728-5734. <https://doi.org/10.1128/mcb.00237-06>
- Yu, H., Bai, X. C., & Wang, W. (2021, Sep 1). Characterization of the subunit composition and structure of adult human glycine receptors. *Neuron*, 109(17), 2707-2716.e2706. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.08.019>
- Yuan, Z., Liang, Z., Yi, J., Chen, X., Li, R., Wu, J., & Sun, Z. (2019, Oct 2). Koumine Promotes ROS Production to Suppress Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation Via NF- κ B and ERK/p38 MAPK Signaling. *Biomolecules*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/biom9100559>
- Yue, R., Jin, G., Wei, S., Huang, H., Su, L., Zhang, C., Xu, Y., Yang, J., Liu, M., Chu, Z., & Yu, C. (2019). Immunoregulatory Effect of Koumine on Nonalcoholic Fatty Liver Disease Rats. *J Immunol Res*, 2019, 8325102. <https://doi.org/10.1155/2019/8325102>
- Zeilhofer, H. U., Acuña, M. A., Gingras, J., & Yévenes, G. E. (2018, Feb). Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics? *Cell Mol Life Sci*, 75(3), 447-465. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2622-x>
- Zeilhofer, H. U., Benke, D., & Yevenes, G. E. (2012). Chronic pain states: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 111-133. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134636>

- Zeilhofer, H. U., Werynska, K., Gingras, J., & Yévenes, G. E. (2021, Jun 6). Glycine Receptors in Spinal Nociceptive Control-An Update. *Biomolecules*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/biom11060846>
- Zeilhofer, H. U., Wildner, H., & Yévenes, G. E. (2012, Jan). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev*, 92(1), 193-235. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2010>
- Zhang, J. Y., Gong, N., Huang, J. L., Guo, L. C., & Wang, Y. X. (2013, Nov). Gelsemine, a principal alkaloid from *Gelsemium sempervirens* Ait., exhibits potent and specific antinociception in chronic pain by acting at spinal alpha3 glycine receptors. *Pain*, 154(11), 2452-2462. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.027>
- Zhang, J. Y., & Wang, Y. X. (2015, Jan). Gelsemium analgesia and the spinal glycine receptor/allopregnanolone pathway. *Fitoterapia*, 100, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.11.002>
- Zhang, N., Wei, W., Mody, I., & Houser, C. R. (2007, Jul 11). Altered localization of GABA(A) receptor subunits on dentate granule cell dendrites influences tonic and phasic inhibition in a mouse model of epilepsy. *J Neurosci*, 27(28), 7520-7531. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1555-07.2007>
- Zhang, X., Chen, Y., Gao, B., Luo, D., Wen, Y., & Ma, X. (2015, Jun). Apoptotic Effect of Koumine on Human Breast Cancer Cells and the Mechanism Involved. *Cell Biochem Biophys*, 72(2), 411-416. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0479-2>
- Zhao, C., Xu, Z., Wang, F., Chen, J., Ng, S. K., Wong, P. W., Yu, Z., Pun, F. W., Ren, L., Lo, W. S., Tsang, S. Y., & Xue, H. (2009, Sep 18). Alternative-splicing in the exon-10 region of GABA(A) receptor beta(2) subunit gene: relationships between novel isoforms and psychotic disorders. *PLoS One*, 4(9), e6977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006977>
- Zhu, H., & Gouaux, E. (2021, Nov). Architecture and assembly mechanism of native glycine receptors. *Nature*, 599(7885), 513-517. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04022-z>
- Zhu, W., & Pan, Z. Z. (2005). Mu-opioid-mediated inhibition of glutamate synaptic transmission in rat central amygdala neurons. *Neuroscience*, 133(1), 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.02.004>
- Zou, G., Chen, Q., Chen, K., Zuo, X., Ge, Y., Hou, Y., Pan, T., Pan, H., Liu, D., Zhang, L., & Xiong, W. (2019, Sep 27). Human Hyperekplexic Mutations in Glycine Receptors Disinhibit the

Brainstem by Hijacking GABA(A) Receptors. *iScience*, 19, 634-646.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.08.018>