



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magíster en Neurobiología

# **“Modulación del receptor alfa-3 de glicina por alopregnanolona”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Neurobiología

SANTIAGO ESTEBAN QUINTANA HERRERA

CONCEPCIÓN-CHILE

2023

Profesor Guía: Dr. Gustavo Moraga-Cid

Profesora co-Guía: Dra. Coralia Rivas Roco

Departamento de Fisiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción

Profesores integrantes del comité evaluador:

Profesor Guía

---

Dr. Gustavo Moraga-Cid  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

---

Dra. Coralia Rivas Roco  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dr. Jose Leonardo Guzman  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Claudio Coddou Álvarez  
Facultad de Medicina  
Universidad católica del norte

Director(s) Programa:

---

Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer:

A los proyectos FONDECYT 1211095 y 1201496, los cuales permitieron el financiamiento de este trabajo.

De manera especial a mi Profesor Tutor y Guía Dr. Gustavo Moraga Cid, por la oportunidad brindada para desarrollarme como investigador, por la **paciencia** constante durante el aprendizaje de técnicas complejas, y por guiarme durante todo el desarrollo de mi proyecto de Tesis.

A mi Profesor Co-guía Dra. Coralia Rivas Rocco, por aportar constantemente con críticas constructivas a lo largo de mi proyecto de Magíster.

De manera especial al Profesor Dr. Carlos Burgos Arias, por presentarme una nueva perspectiva de la bioinformática, complementando siempre mi trabajo con la crítica constructiva de los experimentos llevados a cabo, y por el desarrollo personal y profesional a lo largo de todo el proyecto de Magíster.

A David Flaig Lobos, por su apoyo y guía profesional en los experimentos, crítica de los resultados obtenidos, y por brindar su ayuda durante todo el desarrollo de mi proyecto de tesis.

Al equipo **Ma-Patch-e**, por la colaboración, apoyo en la realización de experimentos y por toda la motivación brindada.

A mi Familia, por su apoyo, amor incondicional, desarrollo profesional y personal, a mis dos hermanos Alonso Quintana y Stefano Quintana por ser mis pilares, y mi Madre Lilian Herrera por siempre brindarme su amor y apoyo durante mi vida.

A mis amigos Francisco Fuentes, Alejandro Vera y Fabian Gálvez por brindarme su apoyo y cariño incondicional durante todo el periodo, por todos sus consejos y ayudarme a seguir caminando en la vida.

Finalmente, a mi pareja Javiera y Chichers por estar siempre a mi lado en momentos difíciles, por todo su cariño y apoyo incondicional.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS .....	4
INDICE DE FIGURAS.....	4
ABREVIATURAS .....	5
1. RESUMEN.....	7
2. ABSTRACT.....	9
3. GRAPHICAL ABSTRACT .....	11
4. INTRODUCCIÓN .....	12
3.1 Características generales del receptor de glicina .....	12
3.2 Composición y expresión del RGLi .....	13
3.3 RGLi $\alpha 3$ .....	15
3.5 Aspectos generales de los neuroesteroides .....	19
3.5 Modulación del RGLi por compuestos neuroesteroidales .....	21
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	26
4.1 Hipótesis .....	26
4.2 Objetivo General .....	26
4.3 Objetivos Específicos.....	26
6. METODOLOGÍA .....	27
5.1 Cultivo celular y Transfección .....	27
5.2 Electrofisiología.....	27
5.3 Estructuras de RGLi $\alpha 3$ .....	29
5.4 Estructura del ligando .....	29
5.5 Docking Molecular .....	30
5.6 Alineamiento de secuencias .....	30
5.7 Simulación de dinámica molecular.....	31
7. RESULTADOS.....	33
6.1 Estudio <i>in silico</i> de Docking proteína-ligando con Rgli $\alpha 3$ y neuroesteroides .....	33
6.2 Comparación estructural entre RGLi $\alpha 1-3$ y RGABA <sub>A</sub> .....	35

6.3 Evaluación del bolsillo de unión mediante simulación de dinámica molecular para RGli $\alpha$ 3 WT y RGli.....	42
6.4 Estudio de la función de RGli $\alpha$ 3 WT mediante técnicas de electrofisiología .....	47
8. DISCUSIÓN.....	53
Estudio de la modulación de RGli $\alpha$ 3 WT, RGli $\alpha$ 3 W239Q y RGli $\alpha$ 3 W239Q A303T con alopregnanolona mediante técnicas electrofisiológicas en células HEK293. ....	57
9. CONCLUSIÓN.....	61
10. BIBLIOGRAFÍA .....	62



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de compuestos neuroesteroidales y su efecto en la función de RGli .....	21
--	----

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1:.....	11
Figura 2:.....	14
Figura 3:.....	17
Figura 4:.....	25
Figura 5:.....	34
Figura 6:.....	35
Figura 7:.....	36
Figura 8:.....	37
Figura 9:.....	38
Figura 10: .....	40
Figura 11.....	41
Figura 12: .....	43
Figura 13: .....	45
Figura 14: .....	46
Figura 15: .....	47
Figura 16: .....	48
Figura 17: .....	50
Figura 18.....	50
Figura 19: .....	51
Figura 20: .....	52

## ABREVIATURAS

RGli	Receptor de glicina
pLGICs	Canales iónicos activados por ligando pentaméricos
RGABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
R5-HT3	Receptor de serotonina de tipo 3
DEC	Dominio extracelular
DTM	Dominio transmembrana
DIC	Dominio intracelular
RGli-ho	Receptor de glicina homopentamérico
RGli-he	Receptor de glicina heteropentamérico
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
MAP	Modulador alostérico positivo
MAN	Modulador alostérico negativo
NS	Neuroesteroide
PROG	Progesterona
PREG	Pregnenolona
ALO	Alopregnanolona
THDOC	Tetrahydrodeoxicorticosterona
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
GFP	Proteína fluorescente verde

HEK 293	Célula embrionaria de riñón humana 293
TSPO	Proteína translocadora
StAR	Proteína reguladora esteroidogénica
ANT	Proteína translocadora de nucleótidos de adenina





## 1. RESUMEN

El receptor de glicina (RGli) es un canal iónico de tipo inhibitorio, miembro de la familia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGICs). Los estudios electrofisiológicos y de comportamiento han demostrado la participación de la transmisión glicinérgica, mediada principalmente por RGli conteniendo la subunidad  $\alpha 3$ , en procesos de ansiedad, depresión y adicción a etanol. Dentro de estas regiones donde se expresa RGli, hormonas esteroidales como la Pregnenolona y alopregnanolona son sintetizadas, las cuales han sido ampliamente caracterizadas como moléculas que median procesos de ansiedad y depresión. De forma interesante, estudios electrofisiológicos han demostrado que la actividad de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del RGli es modulada alostéricamente por el neuroesteroide Pregnenolona. En esta línea, aun cuando los datos experimentales que avalan el rol de la subunidad  $\alpha 3$  del RGli en procesos de ansiedad y depresión han mostrado un aumento sostenido, no existen estudios funcionales que evalúen la modulación de RGli  $\alpha 3$  por hormonas esteroidales que median estos procesos. En base a estos antecedentes, se propone que la función del RGli compuesto por la subunidad  $\alpha 3$  es modulada por compuestos neuroestroidales como Alopregnanolona. Para esto, mediante técnicas de unión molecular proteína – ligando y dinámica molecular *in silico*, en conjunto con registros electrofisiológicos, se generaron

complejos proteína-ligando entre la estructura RGLi  $\alpha 3$  no solamente con Alopregnanolona, sino también con Pregnenolona Sulfatada (PREG-S), Deshidroepiandrosterona (DHEA), Tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC) y Androstanediol ( $3\alpha$ -Diol), con cálculos teóricos de energía libre ( $\Delta G$ ) favorables para su posible unión, y centrándose en la región transmembrana TM1 y TM3. Estos complejos fueron formados solo con la estructura del receptor en su estado abierto, no así en su conformación cerrada. Adicionalmente, los ensayos de dinámica molecular demuestran que esta interacción es estable permitiendo identificar sus residuos importantes como W243, A303, A302, F306 y W239. Los estudios de electrofisiología muestran una modulación alostérica positiva en la función de RGLi  $\alpha 3$  por Alopregnanolona, llegando a un máximo de potenciación del 30% aproximadamente. Para confirmar el sitio de unión para Alopregnanolona, mutamos los residuos de W239Q y A303T, observándose un cambio en la deactivación del canal. En conclusión, nuestros resultados demuestran que la función del receptor de glicina conformado por la subunidad  $\alpha 3$  es potenciada por alopregnanolona, con residuos críticos para su unión como W243 y W239. Futuros experimentos en sistemas neuronales contribuirán a definir la participación de Alopregnanolona en las corrientes tónicas mediadas por RGLi  $\alpha 3$  nivel sináptico.

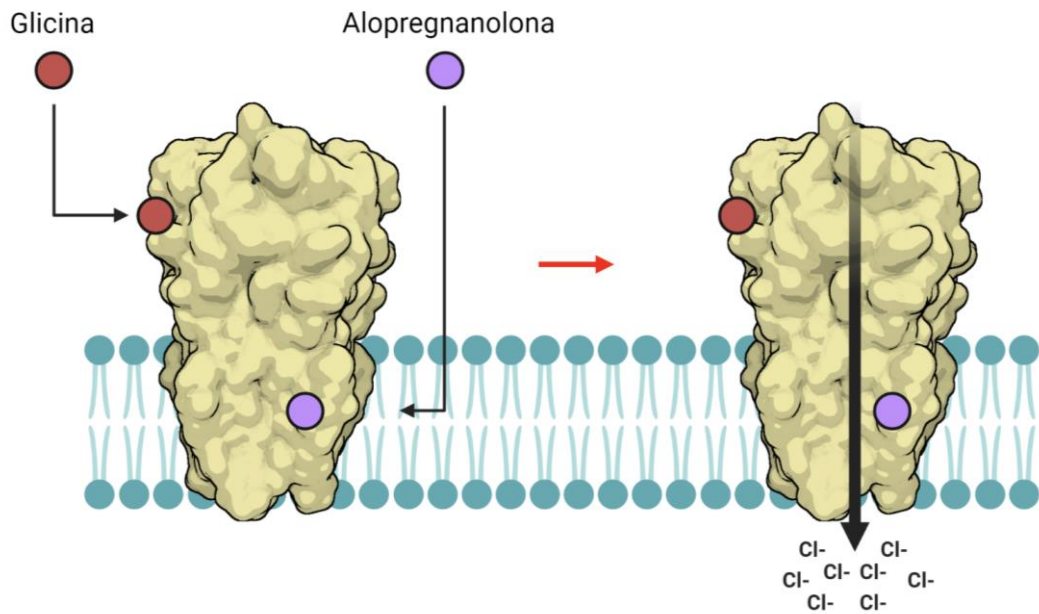
## 2. ABSTRACT

Glycine receptors are inhibitory ionic channels permeable to anions, which belong to the pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) superfamily. In this context, electrophysiological and behavioral studies have reported the participation of the glycinergic transmission, mediated mainly by the GlyR  $\alpha 3$ , in processes like anxiety, depression and ethanol addiction. In the same regions, steroidal hormones such as Pregnenolone and Allopregnanolone are synthesized, and have been characterized as molecules that mediated processes like anxiety and depression. Interestingly, electrophysiological recordings have demonstrated that the function of the GlyR composed by the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  are modulated by the neurosteroid pregnenolone. However, although experimental data supporting the role of GlyR  $\alpha 3$  in anxiety and depression is increasing, there are no experimental data that support the modulation of the GlyR  $\alpha 3$  with neurosteroidal hormones. Here, by using docking, molecular dynamics simulation and electrophysiological recordings, we examined the ability of a set of neurosteroids to bind and modulate the GlyR  $\alpha 3$  function. Our results shows that, the protein-ligand complexes was formed between the receptor and allopregnanolone, pregnenolone sulfate (PREG-S), dehydroepiandrosterone (DHEA), tetrahydroepiandrosterone (THDOC) and  $3\alpha$ -androstenediol ( $3\alpha$ -Diol) with favorable theoretical free energy bind calculations, centered in the transmembrane domain TM1 and TM3. These complexes were only obtained with the receptor in its open conformation. Additionally, the molecular dynamic

simulations shows that the ligand allopregnanolone stays in the predicted binding pocket, reporting critical amino acids like W243, A303, A302, F306 and W239. The electrophysiological studies report a positive modulation of the GlyR  $\alpha 3$  by allopregnanolone, with a potentiation peak of 30%. In conclusion, our results report that the function of the GlyR composed by the  $\alpha 3$  subunit is potentiated by allopregnanolone. For this modulation residues W239 and A303 play a critical role in accommodated the molecule in a putative binding pocket. Future experiments in neural systems will contribute to define the participation of the GlyR  $\alpha 3$  and neurosteroids such as allopregnanolone in a physiological context.



### 3. GRAPHICAL ABSTRACT



**Figura 1: Figura esquemática simplificada de la unión de Alo en RGLi  $\alpha 3$ .** La Alopregnanolona al tener como bolsillo de unión al TMD de RGLi  $\alpha 3$ , ejerce un efecto potenciador en la actividad del receptor.

## 4. INTRODUCCIÓN

### 3.1 Características generales del receptor de glicina

La comunicación neuronal implica el balance entre interacciones excitatorias e inhibitorias. Los canales de la familia pLGICs median estos procesos al permitir cambios rápidos del potencial de membrana a favor de los gradientes electroquímicos de los iones en la membrana plasmática. Dentro de la transmisión inhibitoria, esta consiste en la disminución de la propagación de estos estímulos mediante una hiperpolarización de la membrana plasmática a nivel neuronal (Asari & Meister, 2012; Gamlin et al., 2018).

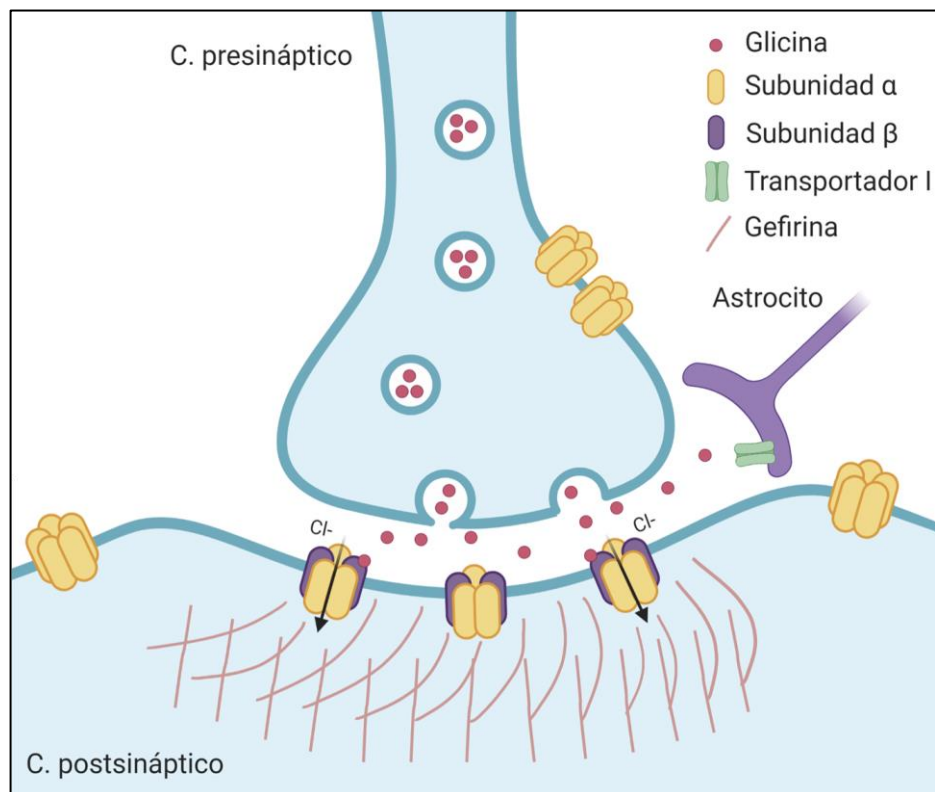


El RGli forma parte de la familia de canales iónicos activados por ligando pentaméricos (pLGICs) junto con los receptores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), nicotínico para acetilcolina (nAChR) y serotonina tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>) (Alexander et al., 2019; Nemezc et al., 2016). RGli es un complejo pentamérico transmembrana, cuyo agonista principal es la glicina, y su unión permite el influjo de iones Cl<sup>-</sup>, lo que genera una hiperpolarización de la membrana celular (Zarbin et al., 1981). La sinapsis glicinérgica es esencial en la neurotransmisión inhibitoria en el SNC y su función regula procesos como la nocicepción, control motor en la médula espinal, control del ritmo respiratorio en regiones del tronco encefálico y procesos cognitivos a nivel

de núcleos neuronales del encéfalo (Legendre, 2001; Lynch, 2004). Su malfuncionamiento está asociado a patologías como la hiperexplexia, dolor crónico y autismo (Bode & Lynch, 2014; Pilorge et al., 2016; Vuilleumier et al., 2018; Zeilhofer et al., 2012).

### 3.2 Composición y expresión del RGLi

El RGLi es un complejo pentamérico, compuesto de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Huang et al., 2017; Lynch et al., 2017). Se han descrito 4 isoformas para  $\alpha$  (1-4), siendo la subunidad  $\alpha_4$  un pseudogen en el genoma humano (Lynch, 2004; Samarut et al., 2019; Simon et al., 2004). La subunidad  $\alpha$  posee los sitios de unión a ligandos, mientras que la subunidad  $\beta$  se asocia con la localización del receptor en el espacio sináptico, debido a su unión con la proteína de anclaje gefirina (Fritschy et al., 2008). El RGLi se expresa como un homopentámero (subunidades  $\alpha$  exclusivamente) o heteropentámero con estequiometría  $2\alpha:3\beta$  o  $4\alpha:1\beta$  (Dawson et al., 2019; Yang et al., 2012) (Figura 2). Estructuralmente, cada subunidad del RGLi posee un dominio amino-terminal extracelular (DEC) donde se encuentra el sitio de unión con sus agonistas, como la glicina. También presenta un dominio transmembrana (DTM) compuesto por 4 hélices anfipáticas (TM1-4), un dominio intracelular entre los segmentos TM3 y TM4, y un corto extremo C-terminal en la región extracelular. La combinación de las cinco subunidades, con una posición central del TM2 de cada una de ellas, conforman el poro selectivo para aniones de  $\text{Cl}^-$ , mientras que los TM4 se ubican en una posición periférica en



**Figura 2: Localización de RGli en el espacio sináptico.** Se visualiza la presencia de RGli-ho en el componente presináptico, y RGli-he a nivel del componente postsináptico junto con RGli-ho en regiones extrasinápticas. Los RGli-he se relacionan con la inhibición postsináptica fásica mientras que RGli-ho con la inhibición tónica.

contacto con los lípidos de la membrana plasmática (Du et al., 2015), siendo una región crítica en la unión con moduladores alostéricos como la ivermectina y el cannabidol (Kumar et al., 2022; Xiong et al., 2011b). La diferencia en la composición del RGli genera variaciones en sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas (Bae et al., 2016, 2018; Fodor et al., 2006; McCracken et al., 2017; Sánchez-Chávez et al., 2017). Los receptores homopentaméricos de glicina (RGli-ho) poseen una mayor conductancia y una



cinética de canal más lenta que los heteropentaméricos (RGli-he). Además, la función de los RGli-ho es afectada sólo por concentraciones altas de antagonistas o bloqueadores como picrotoxinas y estricnina, a diferencia de los RGli-he que presentan una mayor sensibilidad (Deleuze et al., 2005; McCracken et al., 2017). Por otra parte, las distintas subunidades que componen a RGli son expresadas de manera diferencial en el SNC. La subunidad  $\alpha 1$  se encuentra expresada mayormente en la médula espinal en su forma heteropentamérica, con un rol crítico en la regulación de la actividad motora y nocicepción (Ahrens et al., 2008). A su vez, la subunidad  $\alpha 3$  se expresa de manera restringida, a nivel de las láminas I y II del asta dorsal de la médula, con un rol importante en la comunicación sensorial y nocicepción (R. J. Harvey et al., 2004; V. L. Harvey et al., 2009), con una incidencia en la regulación de los ritmos respiratorios (Liu & Wong-Riley, 2013; Mesuret et al., 2018). Finalmente, la subunidad  $\alpha 3$  ha cobrado relevancia a nivel funcional por su participación de las corrientes inhibitorias en núcleos neuronales encefálicos (McCracken et al., 2017).

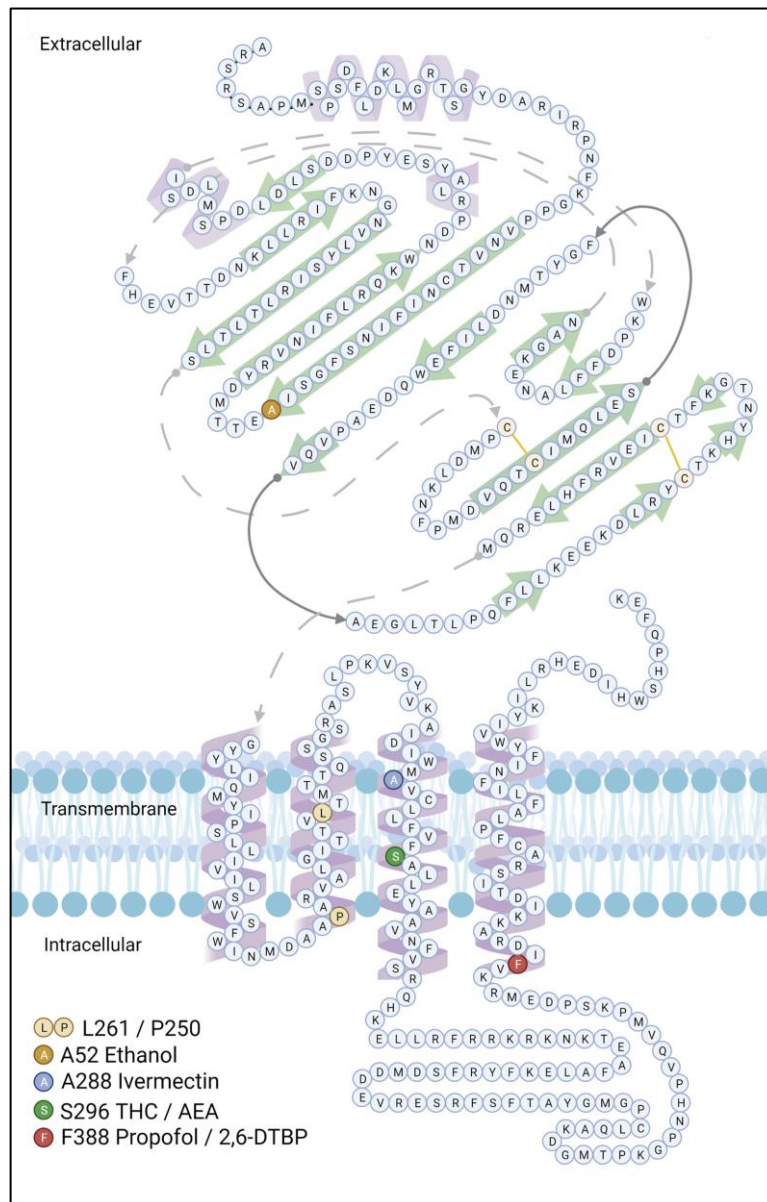
### **3.3 RGli $\alpha 3$**

Estudios de electrofisiología, demuestran la presencia de corrientes evocadas por glicina en regiones del encéfalo como el hipocampo, núcleo acumbens y estriado (Delaney et al., 2010; Förster et al., 2017; Jonsson et al., 2009; Malosio et al., 1991; McCool & Farroni, 2001; McCracken et al., 2017), donde las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  son expresadas. En efecto, estudios

*knock-out* para el gen que codifica para la subunidad  $\alpha 3$  de RGLi GLRA3, demostraron su participación clave en la mantención y regulación de la inhibición tónica de los núcleos neuronales como acumbens, altamente relacionadas con funciones superiores como la cognición, la emoción y el miedo (Bergstrom et al., 2020; Dalley et al., 2004; Everitt & Robbins, 2005; McCracken et al., 2017; Schwienbacher et al., 2004; White, 1996), y el estriado dorsolateral, el cual posee aferencias a los núcleos de los ganglios basales, ampliamente caracterizados por su directa relación con el sistema de recompensa, aprendizaje y memoria (Hawes et al., 2015; Packard & Knowlton, 2002), destacando como blanco terapéutico. Asimismo, estudios de comportamiento sugieren que un aumento de la transmisión glicinérgica en la habénula lateral, una región crítica en la generación de emociones negativas, produjo comportamientos de ansiedad causados por el abuso de etanol (Li et al., 2019), lo que sugiere una relación crucial entre RGLi  $\alpha 3$  con funciones superiores.

### **3.4 Aspectos generales de la desensibilización del RGLi $\alpha 3$**

Dentro de la dinámica del receptor, estudios de crio-microscopia electrónica y electrofisiología han reportado una transición entre 3 estados conformacionales del receptor, denominados como estado de reposo, un estado abierto y finalmente un estado desensibilizado (Gielen & Corringer, 2018; Kumar et al., 2020).



**Figura 3: Modelo topológico y secuencia primaria de la subunidad  $\alpha 3$  de RGLI con el loop intracelular entre TM3 y TM4.** Los residuos críticos que forman parte del bolsillo de unión para moduladores alostéricos para RGLI se indican en color. Los residuos A288, S296 y F388 son cruciales para ligandos que tienen como bolsillo de unión al TMD. Por otra parte, los residuos de Leucina 294 Y prolina 283 han sido reportados como cruciales en la teoría de dual-gate (Acuña et al., 2016; Huang et al., 2017; Lynagh & Lynch, 2010; Mascia et al., 1996; Xiong et al., 2011a, 2012; Zeilhofer et al., 2018).

Con la unión del ligando de glicina se produce un cambio conformacional a nivel del ECD, lo que produce posteriormente un rearrreglo en el TMD. El receptor pasa de su estado de reposo a un estado abierto, para luego terminar en un estado desensibilizado en presencia de su agonista. Este cambio conformacional ha sido propuesto como “dual gate” donde la región crítica en que ocurren estos cambios corresponde al TMD. Se han descrito residuos clave en el TM2 que participan en la conformación cerrada del receptor como 9´Leucina (posición 9 en TM2) formando el punto de constricción para el paso de aniones de cloruro, y 2´Prolina que es crucial en el estado desensibilizado del receptor.(Lape et al., 2012; Yu et al., 2021; Zhu, 2022). Dentro de esta región circundante al TM2 actúan moduladores alostéricos, como los neuroesteroides, teniendo como sitio discreto de unión una región formada por los TM1 y 3, los cuales han cobrado relevancia en los últimos años (Aldred & Mecocci, 2010; Hong et al., 2013; Kanés et al., 2017).

### **3.5 Aspectos generales de la modulación del RGl $\alpha$ 3**

Diversos compuestos modulan la actividad del RGl $\alpha$ 3, entre ellos, anestésicos generales, tropeinas, cannabinoides y compuestos neuroesteroidales (Bukanova et al., 2020; Maksay et al., 2001; San Martín et al., 2019; Xiong et al., 2011b) (Figura 3). Dentro de los moduladores alostéricos que tienen como bolsillo de unión al dominio transmembrana de del RGl $\alpha$ 3, estudios de crio microscopía y registros de electrofisiología reportan que la ivermectina tiene como bolsillo de unión al TMD, generando un

aumento en las corrientes y disminución de la desensibilización del RGli, con una interacción con residuos como Q226, S267 y A288, donde a concentraciones de 1  $\mu$ M genera un efecto en la activación y de-activación del receptor (Huang et al., 2017; Shan et al., 2001). En este contexto, la mutación de A288F generó una insensibilidad del efecto de ivermectina sobre la función del RGli  $\alpha$ 1 (Lynagh & Lynch, 2010). Por otra parte, otro residuo importante en el TMD para la unión de otros moduladores alostéricos es S296. Los compuestos de anandamida (AEA) y tetrahidrocanabidol (THC) generan un efecto de la función del RGli. Tanto para el RGli  $\alpha$ 1 y RGli  $\alpha$ 3, AEA potencia su función, atribuido mayormente a su interacción con S296. Sin embargo, en la estructura de RGli  $\alpha$ 2 la S296 se encuentra cambiada por una A296, donde AEA y THC no generó un efecto de potenciación. Este efecto fue revertido al mutar A296S lo que indica la importancia de S296 en el bolsillo de unión para AEA y THC (Kumar et al., 2022; Xiong et al., 2011a, 2012). Otros compuestos capaces de modular la función del RGli son los compuestos neuroesteroidales, los cuales han ganado relevancia debido a su aplicación clínica.

### **3.6 Aspectos generales de los neuroesteroides**

Las hormonas esteroidales son capaces de modular al SN, y aquellas que son sintetizadas en el SNC para modular su función de manera genómica y no genómica se denominan neuroesteroides (Corpéchet et al., 1985; Dorota Majewska & Schwartz, 1987; Jo et al., 1989). Dichos compuestos cumplen un

rol en la diferenciación sexual, regeneración y mielinización axonal. (Arnold & Breedlove, 1985; Lavaque et al., 2006). Además, desregulaciones en la concentración de NS han sido ampliamente relacionadas con la patogénesis de trastornos del comportamiento y enfermedades neurodegenerativas, sugiriendo un rol neuroprotector, (Aldred & Mecocci, 2010; Boero et al., 2019; Droogleever Fortuyn et al., 2004; Longone et al., 2011; Meltzer-Brody & Kanes, 2020; Naylor et al., 2010).

Los neuroesteroides se sintetizan a partir del colesterol, el cual es translocado desde el medio intracelular a la mitocondria por un complejo proteico conformado por proteínas StAR, TSPO y ANT (Kallen et al., 1998; Porcu et al., 2016). Luego, el colesterol es clivado a pregnenolona por la enzima citocromo P450, el cual es el primer precursor de la vía esteroidogénica, formando posteriormente a dehidroepiandrosterona (DHEA) y alopregnanolona (ALO) (Colciago et al., 2020; Lloyd-Evans & Waller-Evans, 2020; Tuckey & Cameron, 1993). Se observó que la maquinaria enzimática necesaria para el proceso de neuroesteroidogénesis se encuentra en neuronas y astrocitos presentes a nivel del hipocampo, corteza cerebral y la amígdala (Agís-Balboa et al., 2006). Sumado a esto, en la actualidad, fármacos con base en compuestos neuroesteroidales han sido aprobados para su uso médico. Compuestos como la brexanolona prescrita para la depresión postparto (Kanes et al., 2017) y ganaxolona utilizada para el desorden de deficiencia de CDKL5, han sido aprobados entre los años 2020 y 2022 (Yawno et al., 2017), atribuyendo su acción en la modulación de la

función del receptor de GABA tipo A. Sin embargo, a pesar de que estos compuestos sean sintetizados en regiones donde interesantemente RGl $\alpha$ 3 se encuentra expresado, a la fecha no se ha evaluado su posible modulación y su mecanismo de acción sigue sin ser reportado.

### 3.7 Modulación del RGl $\alpha$ por compuestos neuroesteroidales

En la actualidad, estudios de electrofisiología han reportado la modulación de la función del RGl $\alpha$  compuesto por las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2, con compuestos neuroesteroidales como progesterona (PROG), Pregnenolona (PREG), tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC) y deshidroepiandrosterona (DHEA) (Cerdan et al., 2020; Ruiz-Gómez et al., 1989; Sadek et al., 2017; Weir et al., 2004a). Estos compuestos han sido clasificados como moduladores alostéricos positivos (MAPs) y negativos (MANs) dependiendo de su efecto en la función del receptor de glicina. Dentro de estos compuestos, podemos encontrar:

**Tabla 1: Clasificación de compuestos neuroesteroidales y su efecto en la función de RGl $\alpha$  (ND: No determinado debido a su bajo efecto).**

MAP EC <sub>50</sub>	MAN IC <sub>50</sub>	Subunidad del Receptor de Glicina	Sistema de estudio reportado	Literatura
<b>Pregnenolona</b>				
1.4 $\mu$ M ND ND	-	$\alpha$ 1 $\alpha$ 1 $\beta$ $\alpha$ 2	<i>Xenopus laevis</i> oocytes	(Maksay et al., 2001)
<b>Pregnenolona Sulfatada</b>				
-	91 $\pm$ 1.9 $\mu$ M	-	Cultures of spinal cord neurons from chick embryos	(Wu et al., 1990)

-	1.9±0.3 2.7±0.4 5.5±1.3 10.1±0.9 µM	α1 α1β α2 α2β	<i>Xenopus laevis</i> oocytes	(Maksay et al., 2001)
ND	-	α1 α1β	HEK293 Cells	(Wilkins et al., 2016)
-	19.5±2.3 µM	-	Rat spinal cord cells	(Fodor et al., 2006)
-	*	-	Medullary Dorsal horn neurons	(Hong et al., 2013)
<b>Progesterona</b>				
-	-	α1β; α1	HEK 293 cells	(Ziegler et al., 2009)
-	15.6 µM	-	Spinal cord neurons from chick embryos	(Wu et al., 1990)
<b>17α-OH-Progesterona</b>				
-	32 ± 3.2 µM	-	Cultures of spinal cord neurons from chick embryos	(Wu et al., 1990)
<b>Alopregnanolona</b>				
	-	-	Cultured spinal dorsal horn neurons of rats	(Jiang et al., 2006)
0.25 ± 0.19 µM	-	α1	<i>Xenopus laevis</i> oocytes	(Weir et al., 2004b)
ND	-	α1	<i>Xenopus laevis</i> oocytes	(Pistis et al., 1997)
-	*	-	Rat spinal cord cells	(Fodor et al., 2006)
<b>Iso-Alopregnanolona</b>				
-	-	-	Cultured spinal dorsal horn neurons of rats	(Jiang et al., 2006)
<b>Pregnanolona</b>				
-	1.0±0.3 µM	-	Cultured spinal dorsal horn neurons of rats	(Jiang et al., 2006)
-		α1 α2 α3	HEK293 cells	(Jiang et al., 2006)
<b>Iso-Pregnanolona</b>				
-	-	-	Cultured spinal dorsal horn neurons of rats	(Jiang et al., 2006)
<b>Dehidroepiandrosterona sulfatada</b>				
-	6.3±1.4 21.2±5.9 4.2±1.0 19.1±2.6 µM	α1 α1β α2 α2β	<i>Xenopus laevis</i> oocytes	(Maksay et al., 2001)
-	46.3±3.8 µM	-	Rat spinal cord cells	(Fodor et al., 2006)



<b>Testosterona</b>				
-	19.3+2.3 $\mu$ M	-	Pyramidal neurons of rat hippocampus	(Bukanova et al., 2020)
<b>Dihidrotestosterona</b>				
-	20.1+2.8 $\mu$ M	-	Pyramidal neurons of rat hippocampus	(Bukanova et al., 2020)
<b>Androstanediona</b>				
-	18.1+2.9 $\mu$ M	-	Pyramidal neurons of rat hippocampus	(Bukanova et al., 2020)
<b>Dihidroandrostanediona</b>				
-	16.3+2.4 $\mu$ M	-	Pyramidal neurons of rat hippocampus	(Bukanova et al., 2020)
<b>Androstenediol</b>				
-	16.2+2.3 $\mu$ M	-	Pyramidal neurons of rat hippocampus	(Bukanova et al., 2020)
<b>Androsterona</b>				
*	*	$\alpha$ 1 $\beta$ ; $\alpha$ 1	HEK 293 cells	(Ziegler et al., 2009)
<b>Alfaxolona</b>				
27.8 +- 5.8 $\mu$ M	-	$\alpha$ 1	<i>Xenopus laevis</i> oocytes	(Weir et al., 2004b)
-	15.6 $\pm$ 1.5 $\mu$ M	-	Rat spinal cord cells	(Fodor et al., 2006)
70.2 +-21.5 $\mu$ M	-	$\alpha$ 1	HEK 293 cells	(Ahrens et al., 2008)
<b>Betaxalona</b>				
-	208 $\pm$ 43 $\mu$ M	-	Rat spinal cord cells	(Fodor et al., 2006)
<b>Minaxolona</b>				
13.1 (0.9) $\mu$ M	-	$\alpha$ 1	<i>Xenopus laevis</i> oocyte	(Weir et al., 2004b)
<b>Org 20599</b>				
22.9 (1.5) $\mu$ M	-	$\alpha$ 1	<i>Xenopus laevis</i> oocytes	(Weir et al., 2004b)
<b>Co-2-6749</b>				
-	*	-	Rat spinal cord cells	(Fodor et al., 2006)
<b>Tetrahydro-deoxycorticosterona</b>				
ND	-	$\alpha$ 1 $\alpha$ 1 $\beta$	HEK293 Cells	(Wilkins et al., 2016)

En el caso de Alopregnanolona se produce una modulación de manera diferencial en RGli compuesto por la subunidad  $\alpha$ 1. Por los reportes de Weir et al., 2004b, a una concentración de 0.25  $\mu$ M se genera una potenciación de las corrientes evocadas por glicina. Sin embargo, por Fodor et al., 2006, se reportó que alopregnanolona generó una inhibición del 60  $\pm$  8 % de estas corrientes a una concentración de 40  $\mu$ M (Fodor et al., 2006; Weir et al.,

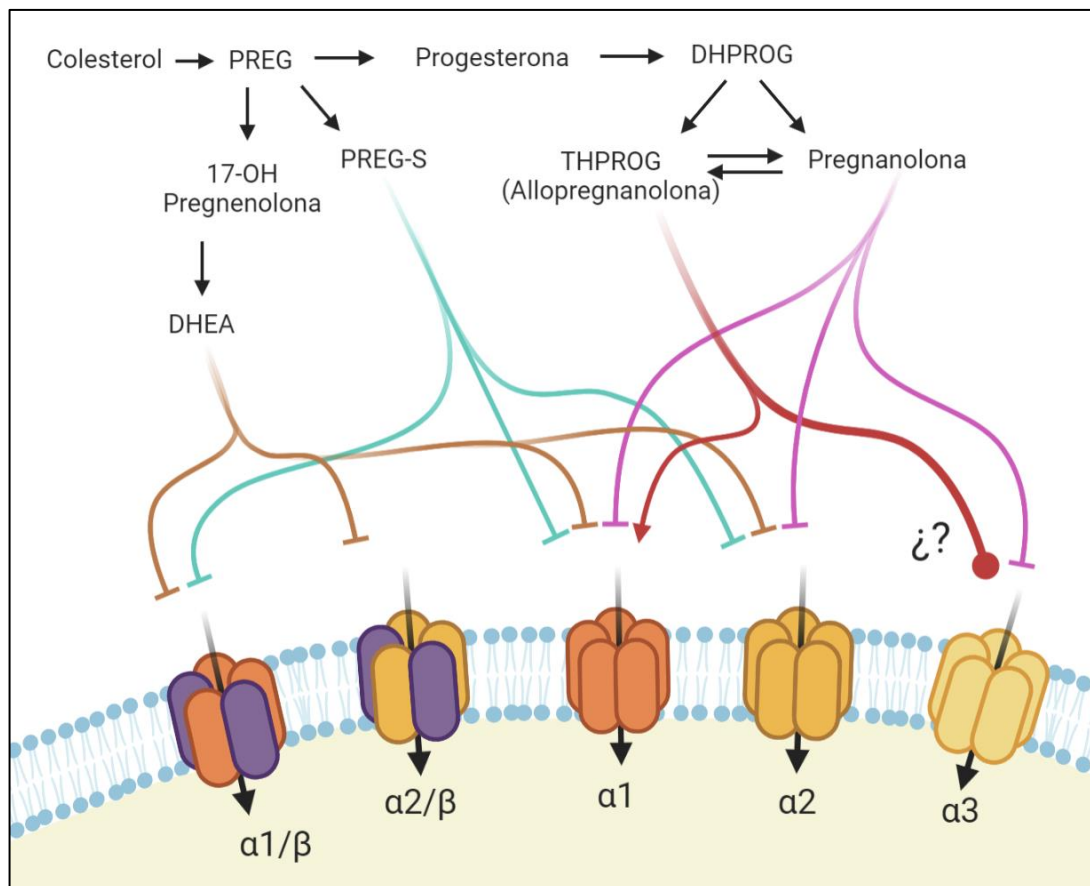
2004b). Esta diferencia puede ser atribuida al tipo de sistema que se utilizó en cada estudio. Sin embargo, a pesar de la modulación producida en estas subunidades, ninguno de estos presenta datos funcionales sobre NS como ALO y DHEA en RGl $\alpha$ 3.

De manera análoga, la función del RGABA<sub>A</sub> es potenciada significativamente por alopregnanolona, llegando a un máximo de potenciación del 750% a una concentración de 1  $\mu$ M (Sugasawa et al., 2020.; Weir et al., 2004b). Dentro de las estructuras cristalográficas reportadas para RGABA<sub>A</sub> con compuestos NS, residuos polares como glutamina 245 y treonina 309, e hidrofóbicos como triptófano 249 e isoleucina 242 componen el bolsillo de unión para el isómero de alopregnanolona denominado Pregnanolona (Miller et al., 2017; Sugasawa et al., n.d.). Por otra parte, mutaciones sitio-dirigidas junto con registros de electrofisiología para este receptor confirman la criticidad de estos residuos para el bolsillo de unión de alopregnanolona en RGABA<sub>A</sub> (Sugasawa et al., n.d.). No obstante, a pesar de la similitud estructural, funcional y relevancia farmacológica que presenta R-GABA<sub>A</sub> y RGl $\alpha$ 3, la modulación de RGl $\alpha$ 3 por ALO no ha sido completamente dilucidada, pese a que los datos experimentales que muestran la participación de la subunidad  $\alpha$ 3 de RGl en núcleos neuronales han incrementado significativamente, no existen estudios funcionales que demuestren efectos moduladores de alopregnanolona en esta subunidad, teniendo en cuenta que:

- 1.- RGl $\alpha$ 3 se expresa en regiones relacionadas a funciones superiores, donde se sintetizan compuestos neuroesteroidales.

2.- Existe una modulación de RGli  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  confirmada experimentalmente para compuestos neuroesteroidales como PREG, PREGS y THDOC.

Por lo que, en base a estos antecedentes, nuestra hipótesis y objetivos buscan demostrar, mediante predicciones *in silico* y registros funcionales de electrofisiología, la modulación de la función del receptor de glicina  $\alpha 3$  con alopregnanolona.



**Figura 4: Representación de la modulación de RGli mediante neuroesteroides y las diferentes subunidades que conforman al receptor.** Los compuestos como DHEA, PREG-S y Pregnanolona disminuyen la función de RGli compuesto por las subunidades  $\alpha 1$ - $2$ - $3$ . Sin embargo, la modulación por Allopregnanolone solo se ha demostrado para RGli  $\alpha 1$ .

## 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1 Hipótesis

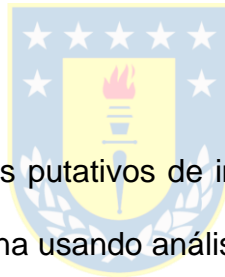
La función del receptor de glicina  $\alpha 3$  es modulada por alopregnanolona.

### 4.2 Objetivo General

Caracterizar la modulación de la función del receptor de glicina  $\alpha 3$  por alopregnanolona.

### 4.3 Objetivos Específicos

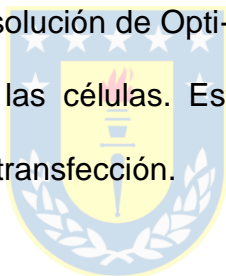
1. Caracterizar los sitios putativos de interacción entre el receptor de glicina y alopregnanolona usando análisis *in silico*.
2. Determinar si la función del receptor de glicina  $\alpha 3$  es modulado por alopregnanolona mediante registros electrofisiológicos en células HEK293.
3. Caracterizar el potencial sitio de unión de alopregnanolona mediante electrofisiología y mutaciones sitio-dirigidas.



## 6. METODOLOGÍA

### 5.1 Cultivo celular y Transfección

Células HEK293 (Human Embryonic Kidney) fueron cultivadas usando métodos estandarizados en nuestro laboratorio (cita). Las células fueron cotransfectadas transientemente mediante Lipofectamina 2000, utilizando 1,5  $\mu\text{g}$  del plásmido codificante para la subunidad  $\alpha 3$  del receptor de glicina y 1  $\mu\text{g}$  del plásmido codificante para GFP como marcador de transfección positiva. Estos fueron añadidos a una solución de Opti-MEM® (Invitrogen), la cual fue aplicada directamente sobre las células. Estas células fueron estudiadas después de 18-24 horas post-transfección.



### 5.2 Electrofisiología

La solución externa está compuesta de (mM): 150 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES. Esta solución fue ajustada a un pH de 7.35 y a una osmolaridad de 320-330 mOsm, la cual fue almacenada a 4°C. La solución interna está compuesta de (mM): 120 CsCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP-Na<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 0.5 GTP y 10 HEPES. Esta solución fue ajustada a un pH de 7.35 y a una osmolaridad entre 290-310 mOsm, almacenada a -20 °C. La solución de glicina fue preparada para llegar a un stock de 10 mM almacenada a -20 °C, la cual fue diluida en solución externa al momento de realizar los

experimentos. Para la solución con alopregnanolona, se utilizó DMSO al 100% para la solución base. Luego esta solución fue diluida en solución externa para la obtención de las soluciones con su concentración de trabajo correspondiente para su uso en los registros de electrofisiología. Los registros de electrofisiología en la modalidad de célula completa (*whole-cell*), fueron realizados incorporando la solución interna dentro de un capilar de borosilicato pulido anteriormente, donde se encuentra el electrodo de referencia. Las células fueron depositadas en un pocillo Nunc y embebidas en solución externa. Las células que presentaban una transfección positiva fueron identificadas mediante un dispositivo de luz ultravioleta con un filtro FITC, gracias a su emisión de fluorescencia. Manteniendo un potencial de membrana de -60 mV, las corrientes de glicina fueron evocadas mediante un dispositivo de microperfusión, con concentraciones de glicina entre 10-1500  $\mu\text{M}$ . Estas corrientes fueron registradas por un amplificador EPC10 (HEKA Electronics, Alemania) y almacenadas en el software de PatchMaster (HEKA Electronics, Alemania). Estas corrientes fueron analizadas utilizando la ecuación.

$$I_{\text{gli}} = I_{\text{max}}(\text{gli}) \frac{\text{nh}((\text{gli})^{\text{nh}} + (\text{EC}_{50})^{\text{nh}})}{\text{nh}}$$

donde **I<sub>max</sub>** corresponde a la corriente máxima obtenida en presencia del agonista de glicina, y **nh** corresponde al número de Hill. El mismo protocolo fue utilizado para la medición de corrientes evocadas por glicina para el receptor con la mutación W239 y A303T. Todos los registros analizados fueron

cuantificados mediante ClampFit 9.0 (Axon Instruments), en donde la conversión de los datos fue obtenida mediante Origin 6.0 (Microcal USA).

Las puntas de borosilicato empleadas en los registros fueron realizadas en un micro-puller (PC-100), y pulidas en micro-forga (MF-830, Narishige Japan),

### **5.3 Estructuras de RGLI $\alpha$ 3**

Las estructuras del receptor de glicina  $\alpha$ 3 fueron obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (PDB ID: 5TIO, 5CFB) en sus conformaciones abierta y cerrada, respectivamente, y preparadas previo su utilización mediante Protein Preparation Wizard (Madhavi Sastry et al., 2013) de Maestro (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021). Este proceso incluyó la adición de los átomos de hidrógeno no enlazados, eliminación de moléculas de agua, predicción de los estados de protonación y corrección de enlaces energéticamente desfavorables junto con las cargas formales de la estructura.

### **5.4 Estructura del ligando**

Las estructuras de los neuroesteroides fueron obtenidas desde la base de datos PubChem, y preparadas utilizando LigPrep (LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.) generando su estado de ionización con un pH de 7.0  $\pm$  0.2 con epik en el software de Maestro (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021). Estas fueron Alo (CID: 92786), THDOC (CID: 101771), 3 $\alpha$ -Diol (CID: 15818), PREGS (CID: 105074) y DHEAS (CID: 12594).

## 5.5 Docking Molecular

El docking proteína-ligando se realizó empleando las estructuras del receptor de glicina  $\alpha 3$  en su conformación abierta y cerrada. Como primer paso, el docking molecular fue realizado mediante Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021; Trott & Olson, 2010), clasificando los complejos obtenidos según su docking score. Como segundo paso, una vez los complejos fueron obtenidos, se realizó un docking proteína-ligando restringido a esta región mediante Glide (Friesner et al., 2006; Halgren et al., 2004). Cálculos teóricos de energía libre fueron realizados mediante Prime MM-GBSA (Jacobson et al., 2002, 2004). Todas las imágenes fueron obtenidas mediante el software de Maestro (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) y pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.).

## 5.6 Alineamiento de secuencias

Las secuencias para el receptor de glicina  $\alpha 1-3$  y para el receptor de GABA tipo A fueron obtenidas de la base de datos de UniProt (GLRA1: P23415; GLRA2: P23416; GLRA3: O75311; GABRA1: P14867; GABRA5: P31644). El alineamiento fue realizado mediante Clustal Omega de EMBL-EBI (Madeira et al., 2022).



## 5.7 Simulación de dinámica molecular

Las poses generadas anteriormente fueron replicadas 5 veces para formar el receptor homopentamérico con los cinco posibles bolsillos de unión ocupados. El complejo final fue centrado en una membrana de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) y el sistema completo fue solvatado mediante un modelo de agua *single point charge* (SPC). Concentraciones iónicas de sodio y cloruro fueron añadidas al sistema en una concentración de 0.15 M en ambos lados de la membrana, manteniendo una temperatura y presión constante a 300 K y 1.01325 bar. Subsecuentemente el sistema fue equilibrado durante 20 ns con restricciones de  $5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ . Luego, las restricciones fueron removidas, ejecutando una simulación de 500 ns utilizando un ensamble semi-isotrópico NPT, con una constante de tensión de superficie de 0.0 bar Å para la producción. Las dinámicas moleculares fueron realizadas en Desmond (Bowers et al., 2006, Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2021.) utilizando un campo de fuerza OPLS2005. Los análisis de contacto entre la superficie del receptor y del ligando fueron producidas mediante Desmond. El mismo procedimiento fue realizado para el receptor que presenta las mutaciones para W239Q y A303T. Dentro de la producción de 500 ns, se realizó un análisis de clusters, definiendo un límite de RMSD cut off en 1 Å. El análisis de clusters fueron realizados en Maestro (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) y analizadas mediante el comando de Clustering “ligand receptor interaction frequency” (Peña-Varas & Ramírez, 2021). Similarmente,

el análisis de clusters fue realizado para el receptor de glicina que presenta las mutaciones W239Q y A303T.

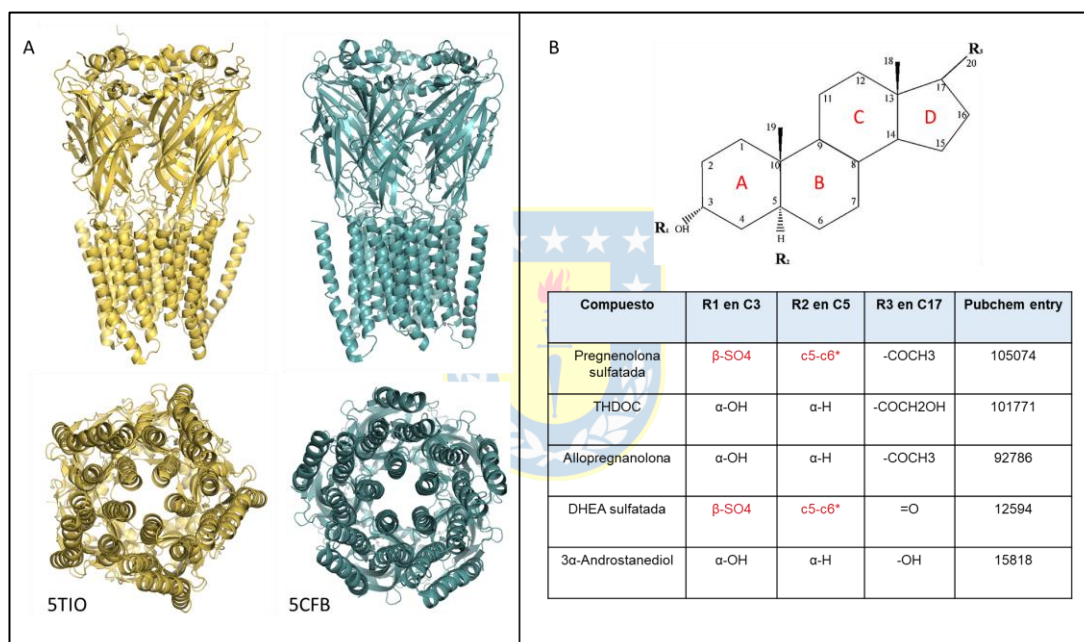


## 7. RESULTADOS

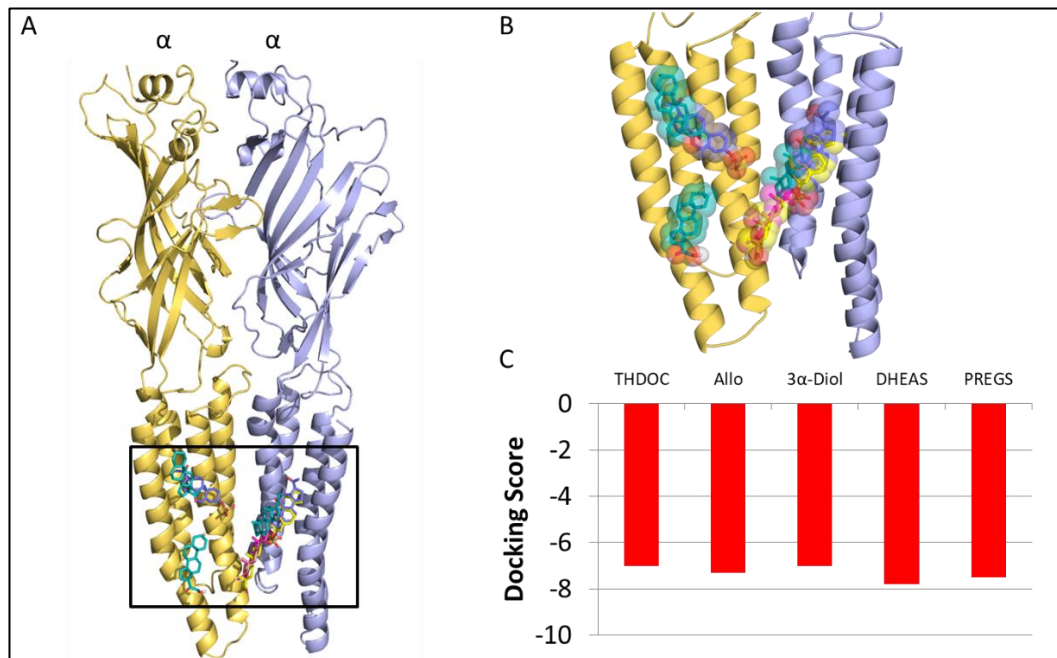
### 6.1 Estudio *in silico* de Docking proteína-ligando con RgIi $\alpha 3$ y neuroesteroides

Para evaluar la posible interacción entre el receptor de glicina  $\alpha 3$  y los compuestos neuroesteroidales, realizamos un docking proteína-ligando entre RgIi  $\alpha 3$  en su conformación abierta y cerrada (Figura 4A), con los compuestos Alo, PREG-S, DHEA-S, THDOC y  $3\alpha$ -Diol los cuales comparten el esqueleto neuroesteroidal, con una diferencia en los grupos funcionales ubicados en R1, R2 y R3 (Figura 4B). En primer lugar, realizamos un docking molecular utilizando el dominio transmembrana como proteína blanco. En esta condición, los complejos formados solo fueron obtenidos para el receptor en su conformación abierta, (Figura 5A). Los compuestos como Alo,  $3\alpha$ -Diol y THDOC comparten un sitio similar, junto con una orientación del hidroxilo ubicado en el C<sup>3</sup> en dirección al TM1, y una cetona en C<sup>17</sup> en orientación hacia el TM3 (Figura 5B). Estos complejos presentan un docking score negativo con un valor alrededor de -6 a -8 (Figura 5C). Para identificar el posible bolsillo de unión entre RgIi  $\alpha 3$  y estos compuestos, realizamos un docking dirigido proteína-ligando, utilizando como grilla de unión la región identificada anteriormente (Figura 6). Dentro de estos complejos, con Alopregnanolona, residuos como W239 y W243 se encuentran presentes en

su bolsillo de unión (Figura 6A y 7A), caso similar para los Ns como 3 $\alpha$ -Diol y THDOC (Figura 6B, 6C, 7B y 7C) donde W243 forma un puente de hidrógeno con estos. Por otra parte, los NS sulfatados, presentan una diferencia en su posición y orientación, con una mayor interacción con TM4 (Figura 6D, 6E, 7D y 7E). Sumado a esto, para corroborar la estabilidad energética de los complejos formados, realizamos un cálculo teórico energético, obteniendo valores entre -57.4 hasta -66.4 kcal\* $\text{mol}^{-1}$  (Figura 7F).



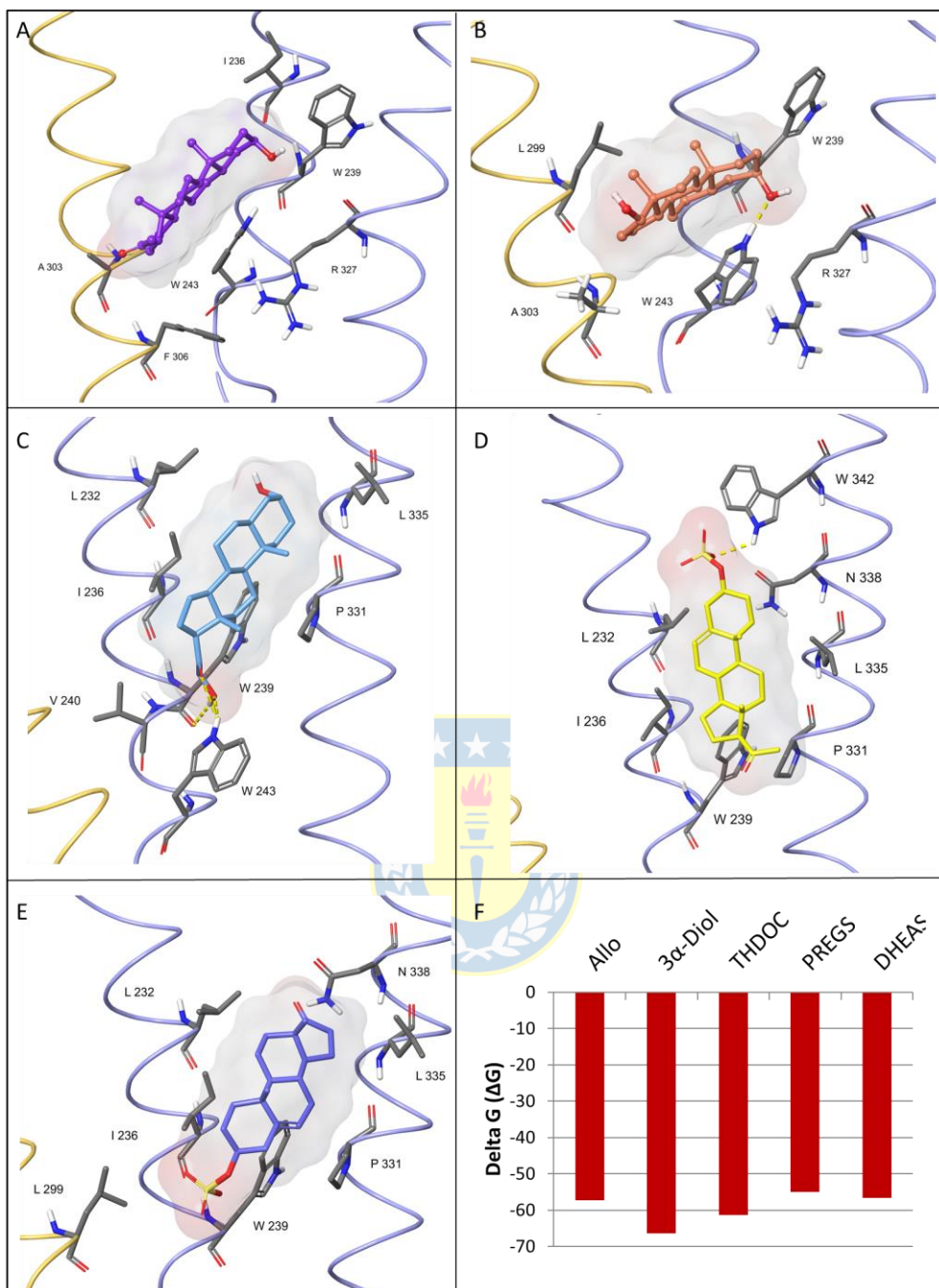
**Figura 5: Estructura de RGLI  $\alpha$ 3 y compuestos neuroesteroidales.** (A) Estructura del receptor en su conformación abierta 5TIO y su conformación cerrada 5CFB. (B) Estructura de los compuestos neuroesteroidales con los grupos funcionales críticos diferenciados en R1, R2 y R3.



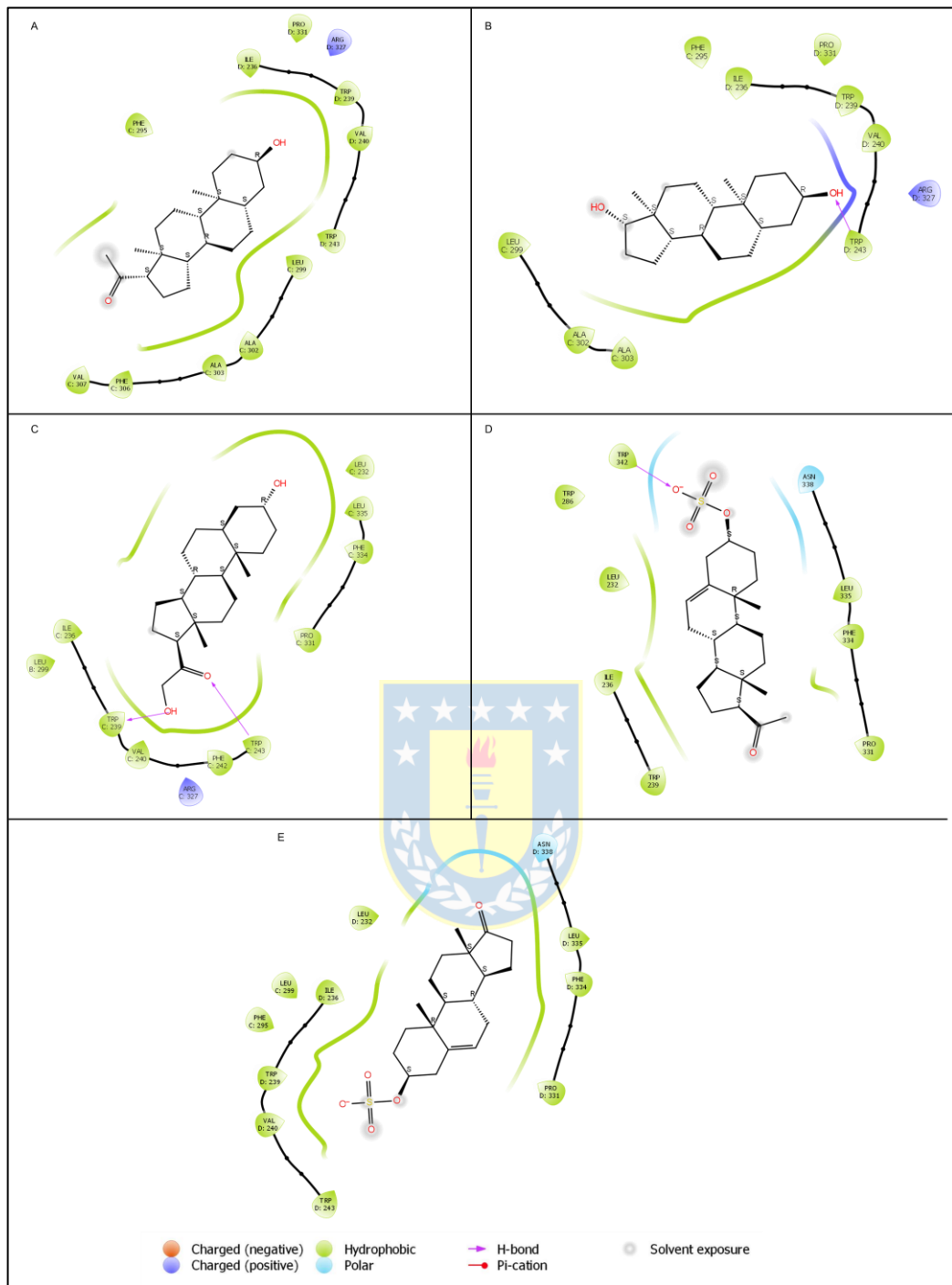
**Figura 6: Docking proteína-ligando mediante Autodock Vina.** Representadas como Alopregnanolona (Morado), 3-Diol (Naranja), THDOC (Celeste), PREG-S (Amarillo) y DHEAS (Rojo), con el receptor de glicina  $\alpha 3$ . (A, B) Representación de dos subunidades de RGLi  $\alpha 3$  con el TMD como sitio principal para NS. (C) El gráfico representa el Docking Score obtenido de cada complejo.

## 6.2 Comparación estructural entre RGLi $\alpha 1-3$ y RGABA<sub>A</sub>

Dentro de la familia pLGICs, la actividad del receptor de GABA tipo A, es aumentada por alopregnanolona a concentraciones nanomolares, generando hasta 500-700% de potenciación (Sugasawa et al., n.d.; Weir et al., 2004b), es por esto que, para comparar los bolsillos de unión entre RGABA<sub>A</sub> y RGLi  $\alpha 3$  realizamos un alineamiento múltiple



**Figura 7: Docking proteína-ligando obtenido entre RGlI  $\alpha 3$  con NS mediante Glide.** (A) Representación del complejo obtenido para Alopregnanolona. La misma representación fue realizada para 3-Androstanediol (B), THDOC (C), PREG-S (D) y DHEAS (E). (F) El gráfico representa el cálculo teórico energético obtenido para los distintos complejos.



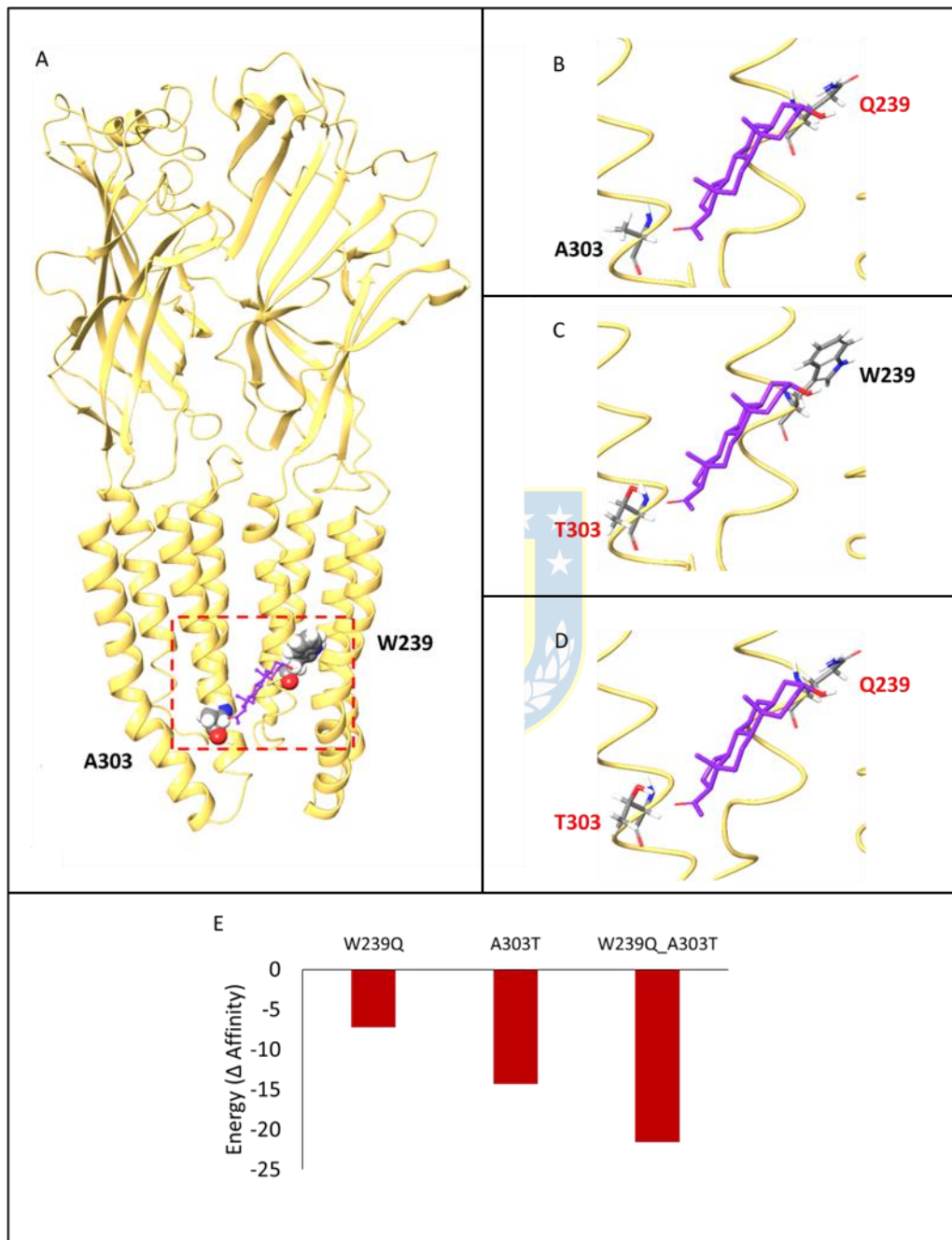
**Figura 8: Diagrama 2D de interacción del ligando entre RGLI  $\alpha$ 3 con Alopregnanolona (A), 3 $\alpha$ -Diol (B), THDOC (C), PREG-S (D) y DHEAS (E). Diagrama 2D obtenido desde los complejos proteína-ligando mediante Maestro.**





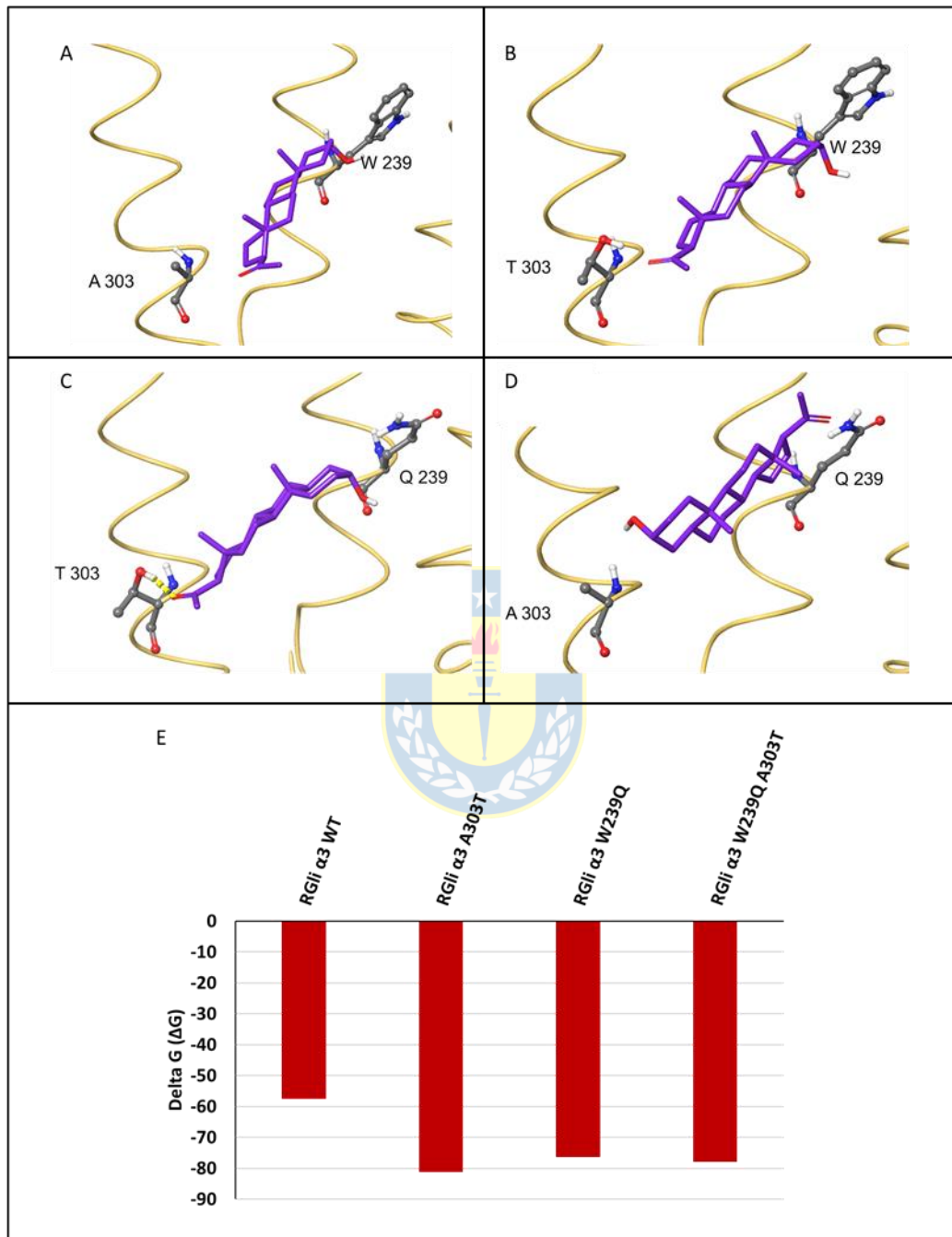
de secuencias, centrado principalmente en el TMD (Figura 9). Dentro de las principales diferencias entre las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\beta$  de RGLi frente a las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 5$  de RGABA<sub>A</sub> encontramos a residuos como Q239 y T303, los cuales han sido identificados como críticos para la unión de compuestos neuroesteroidales con RGABA<sub>A</sub> (Miller et al., 2017). Estos residuos no se encuentran presentes en RGLi  $\alpha 3$ , lo que podría sugerir una diferencia en la modulación producida por Alo sobre la actividad de cada uno de estos receptores, tanto para RGLi  $\alpha 3$  y RGABA<sub>A</sub> (Figura 8A). En conjunto, estos resultados indican que una parte importante del bolsillo de unión de RGLi  $\alpha 3$  con Alopregnanolona, está conformada por los residuos W239 y A303. Bajo este criterio, realizamos una mutación sitio-dirigida mediante Maestro (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) para los residuos de W239Q y A303T en RGLi  $\alpha 3$  (Figura 10A). Dentro de los cálculos teóricos de estabilidad para los residuos mutados, estos contribuyen a la estabilidad del receptor en un orden de -7,25 para W239Q, -14,31 en A303T y -21,58 para W239Q A303T (Figura 10B-D), Estos resultados sugieren que la mutación de estos residuos no afecta de manera crítica a la estabilidad de la proteína (Figura 10E). Para comprobar si esta mutación genera un cambio en el bolsillo de unión para Alopregnanolona, realizamos nuevamente un docking proteína-ligando en las situaciones de RGLi  $\alpha 3$  WT, RGLi  $\alpha 3$  W239Q, RGLi  $\alpha 3$  A303T y RGLi  $\alpha 3$  W239Q A303T (Figura 11A-D). Dentro del cálculo teórico energético obtenido, tendremos un  $\Delta G$  para RGLi  $\alpha 3$  W239Q, RGLi  $\alpha 3$  A303T y RGLi  $\alpha 3$  W239Q A303T entre -70 y -85 kcal\* $\text{mol}^{-1}$ , a diferencia de su control RGLi  $\alpha 3$  WT con un  $\Delta G$  de -57,37 kcal\* $\text{mol}^{-1}$  (Figura 11E). Para generar una mayor

caracterización dentro de las diferencias encontradas en los resultados de docking molecular, realizamos simulaciones de dinámica molecular para RGLi  $\alpha 3$  WT y RGLi  $\alpha 3$  W239Q A303T con Alopregnanolona.



**Figura 10: Energía de afinidad de los complejos obtenido mediante alanine scanning residue.** (A) Los residuos seleccionados para la mutación son W239Q y A303T ubicados en el TMD de RGLi  $\alpha 3$ , donde encontramos los complejos de (B) RGLi

$\alpha 3$  W239Q, (C) RGli  $\alpha 3$  A303T y (D) RGli  $\alpha 3$  W239 A303T. (E) Los rangos de energía fueron rankeados en orden de menor a mayor afinidad.

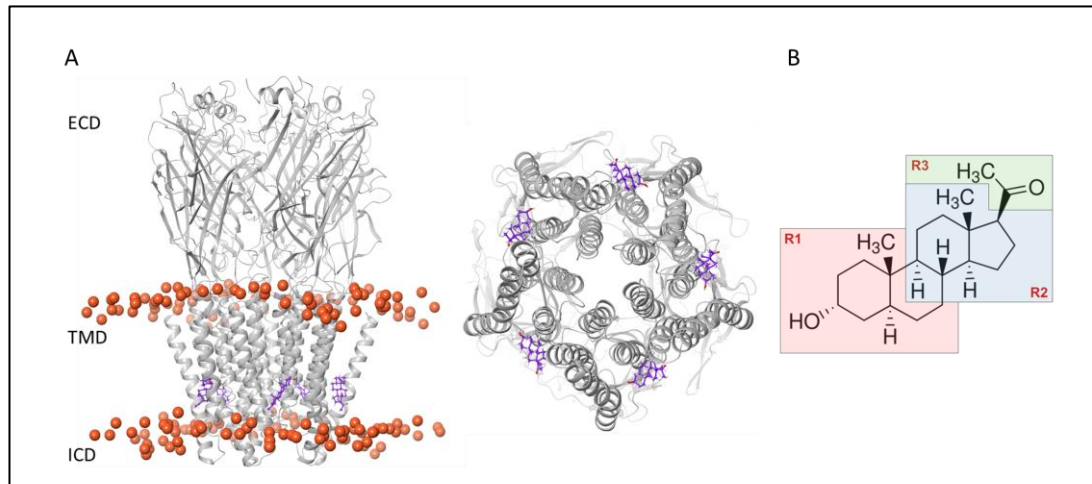


**Figura 11: Docking proteína-ligando obtenido entre RGli  $\alpha 3$  W239Q, RGli  $\alpha 3$  A303T y RGli  $\alpha 3$  W239Q A303T mediante Glide. (A) Representación del complejo obtenido para RGli  $\alpha 3$  WT. La misma representación fue realizada para (B) RGli  $\alpha 3$  A303T, (C) RGli  $\alpha 3$  W239Q y (D) RGli  $\alpha 3$  W239Q A303T. (E) El gráfico representa los cálculos teóricos energético-obtenidos para los complejos.**

### 6.3 Evaluación del bolsillo de unión mediante simulación de dinámica molecular para RGLI $\alpha$ 3 WT y RGLI

Basados en los resultados de docking proteína-ligando para RGLI  $\alpha$ 3 con Alopregnanolona, fueron posicionados los complejos para RGLI  $\alpha$ 3 WT y RGLI  $\alpha$ 3 W239Q A303T en una bicapa fosfolipídica, generando una simulación de dinámica molecular de 500 ns, con un equilibrado previo de ambos sistemas de 20 ns (Figura 12A), clasificando las regiones de interacción de la estructura de Alopregnanolona para su mejor identificación (Figura 12B). Para analizar la estabilidad de ambos complejos durante la simulación, el RMSD de la estructura del receptor RGLI  $\alpha$ 3 WT y RGLI  $\alpha$ 3 W239Q A303T, fue monitoreada alcanzando valores entre 1-2 Å, sin cambios significativos en el transcurso de ambas dinámicas (Figura 13A-14A). En consiguiente, para analizar la orientación, posicionamiento e interacción de cada simulación, se seleccionaron los 1000 conformeros de cada condición, para realizar un análisis de *clustering* (1 pose por cada 0.5 ns de los 500 ns de la producción completa). Dentro de los clusters formados para cada condición, identificamos grupos con alta representatividad para la condición de RGLI  $\alpha$ 3 W239Q A303T, a diferencia de RGLI  $\alpha$ 3 WT, que presenta una menor cantidad de conformeros en el cluster de mayor población (Figura 13B-14B). Estos resultados indican que, Alo adopta una posición con un menor movimiento dentro del bolsillo de unión, lo cual indica una mayor estabilidad del conformero a lo largo de la dinámica para RGLI  $\alpha$ 3 W239Q A303T, a diferencia de la condición RGLI  $\alpha$ 3

WT. Utilizando cada cluster con mayor representatividad, se realizó un análisis de la interacción en cada uno de los 5 bolsillos de unión,

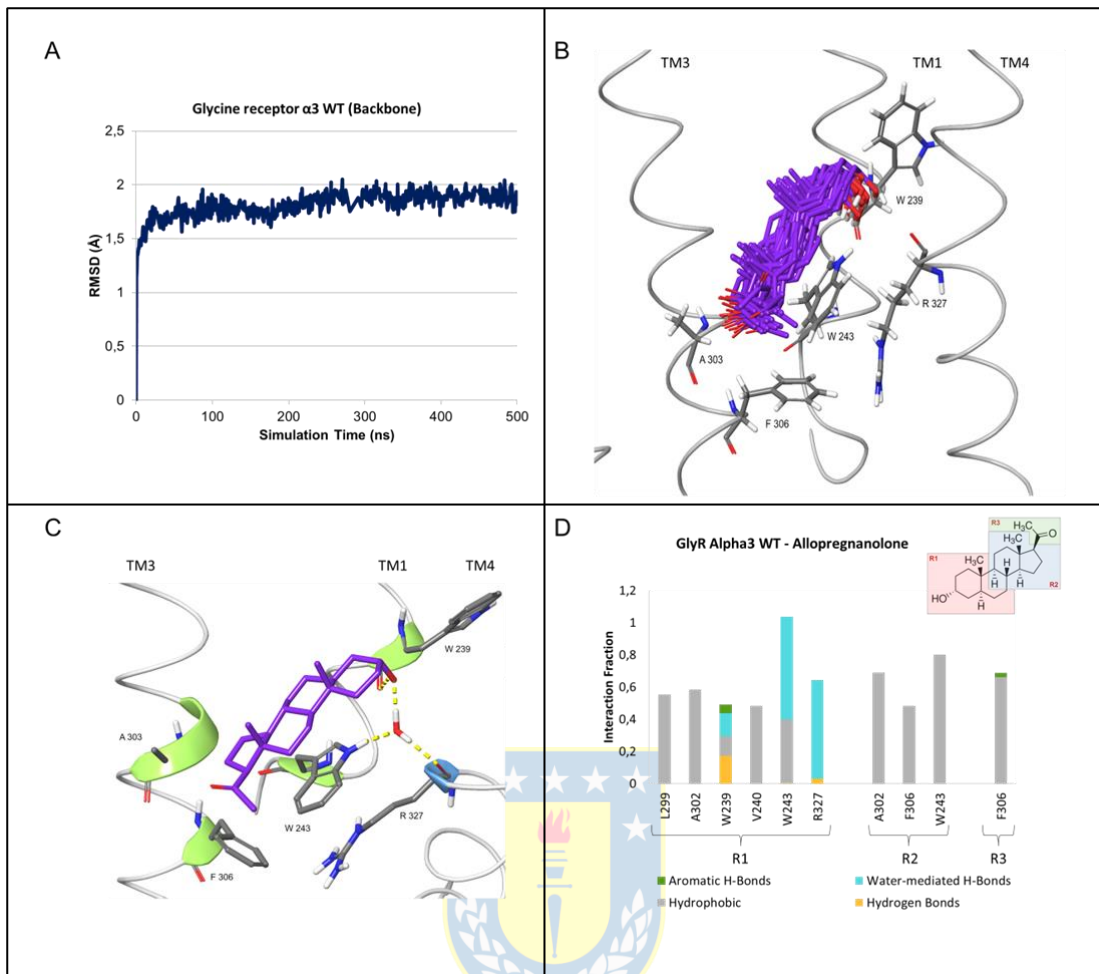


**Figura 12: Representación de la simulación de dinámica molecular para RGLI  $\alpha 3$  WT.** (A) Dentro del dominio transmembrana se encuentran los 5 bolsillos de posible unión para Alo, donde los fosfatos de los fosfolípidos fueron resaltados para una mejor visualización del posicionamiento de la membrana. (B) Diferencia en las regiones de posible interacción de Alo con RGLI  $\alpha 3$ .

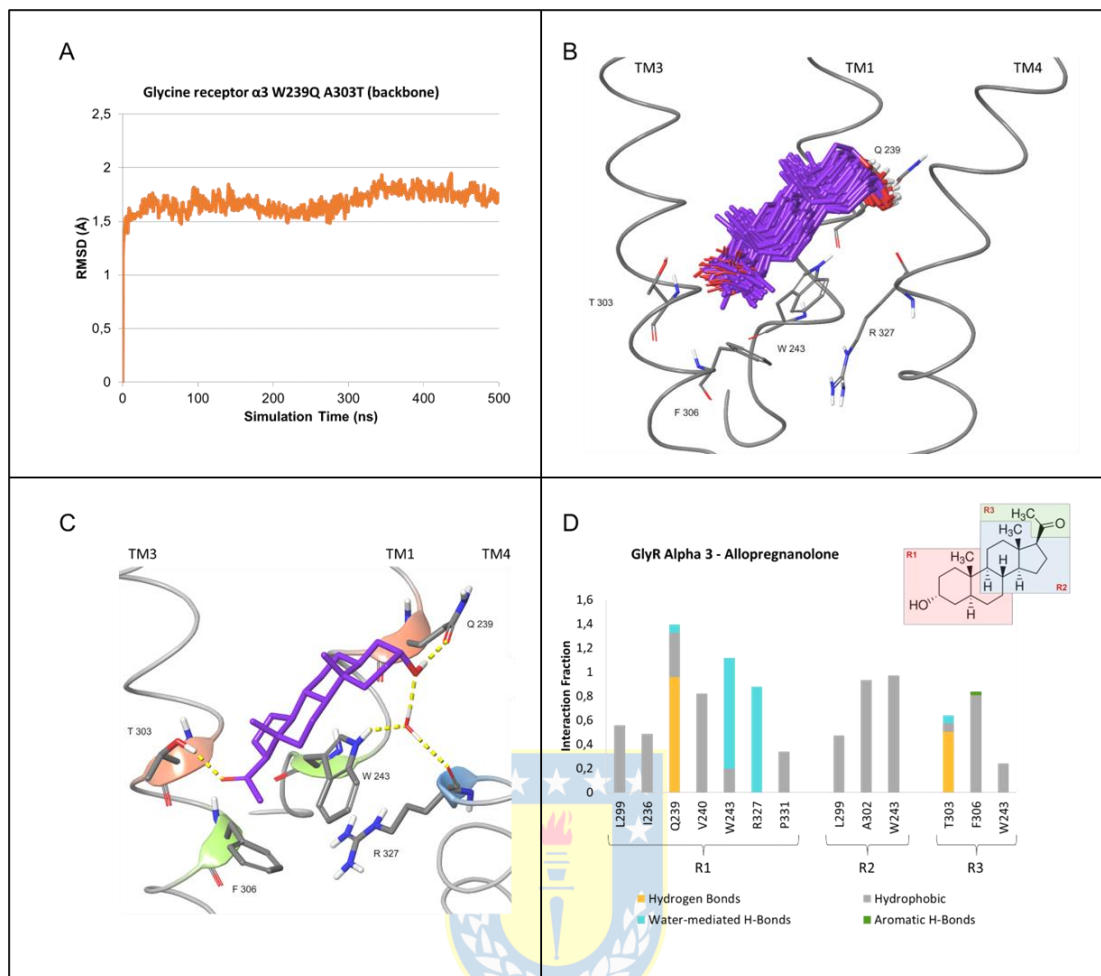
para ambas condiciones. Para RGLI  $\alpha 3$  WT, dentro de las interacciones representativas, podemos observar que L299, A302, V240 y W243 presentan contactos hidrofóbicos. Por otra parte, W243 y R327 presentan un puente de hidrógeno mediado por agua, el cual se mantiene a lo largo de la simulación. Solo W239 presenta un puente de hidrógeno, sin embargo, este solo representa un 20% de la interacción total que presenta este residuo a lo largo de la dinámica (Figura 13C-D). La mayoría de estos contactos se producen en las regiones R1 del esqueleto neuroesteroidal. Por su parte, para RGLI  $\alpha 3$

W239Q A303T, se mantienen los puentes de hidrógeno mediados por agua para W243 y R327, junto con un puente de hidrógeno formado con el residuo mutado de W239Q el cual participa en un 100% de la interacción de este residuo a lo largo de la dinámica. Estas interacciones están presentes en el R1 del esqueleto, donde se ubica el grupo hidroxilo en C<sup>3</sup> del esqueleto neuroesteroidal. Asimismo, el residuo mutado de A303T genera un puente de hidrógeno ubicado en el R3 de la estructura de Alo, donde esta interacción conforma el 40% de la interacción que presenta este residuo con el ligando de Alo (Figura 14C-D). Estos resultados obtenidos indican que los residuos de W239Q y A303T, al generar estas interacciones con los grupos funcionales del esqueleto de Alo, conforman una parte crucial de las uniones que mantienen al ligando en el bolsillo de unión.

Esta evidencia, sumada con el resultado de docking proteína-ligando sugieren que Alo tiene como bolsillo principal de unión al dominio transmembrana del RGl $\alpha$ 3, principalmente para TM1 y TM3 de RGl $\alpha$ 3 WT, prediciendo una interacción mayormente hidrofóbica, con puentes de hidrógeno críticos formados los residuos mutados de W239Q y A303T. Para demostrar esta interacción y el efecto que produce alopregnanolona en la actividad de RGl $\alpha$ 3 WT y RGl $\alpha$ 3 W239Q A303T, fueron realizados registros de electrofisiología.



**Figura 13:** Representación del bolsillo de unión de RGli  $\alpha 3$  WT con Alo. (A) Gráfico de RMSD durante los 500 ns del tiempo de la simulación. (B) Cluster de Alo en el bolsillo de unión para RGli  $\alpha 3$  WT. (C) Ilustración concreta de la interacción entre Alo con W243 y R327. (D) Gráfico de la fracción de interacción entre los residuos del bolsillo para Alo, destacando una interacción hidrofóbica, y puentes de hidrógeno mediados por agua.

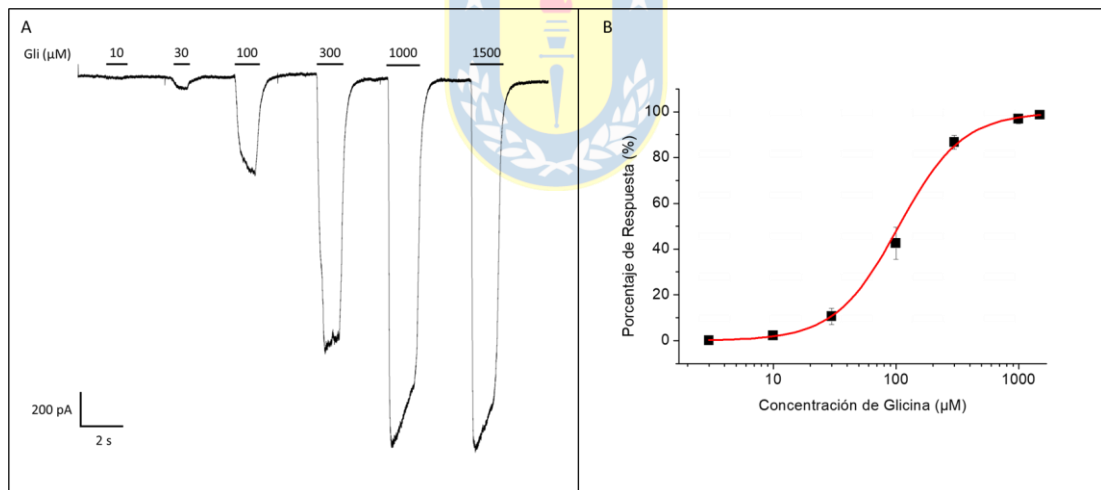


**Figura 14:** Representación del bolsillo de unión de RGLI  $\alpha 3$  W239Q y A303T con Alo. (A) Gráfico de RMSD durante los 500 ns del tiempo de la simulación. (B) Cluster de Alo en el bolsillo de unión para RGLI  $\alpha 3$  WT. (C) Ilustración concreta de la interacción entre Alo, con puentes de hidrógeno formados con W239 y T303, junto con W243 y R327 mediados por agua. (D) Gráfico de la fracción de interacción entre los residuos del bolsillo para Alo, destacando una interacción de puentes de hidrógeno y otros mediados por agua.



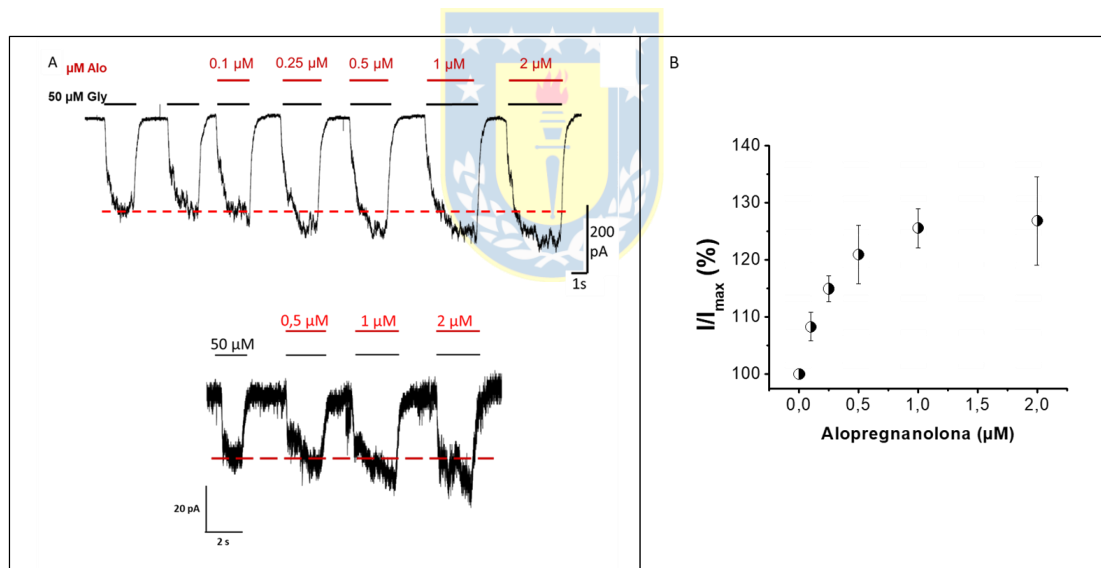
## 6.4 Estudio de la función de RGl $\alpha$ 3 WT mediante técnicas de electrofisiología

Para evaluar la posible modulación de RGl $\alpha$ 3 con Alopregnanolona, y además comprobar la diferencia propuesta en los complejos predichos *in silico* para RGl $\alpha$  WT y RGl $\alpha$ 3 W239Q A303T, se realizaron experimentos de patch clamp en la modalidad de célula completa en cultivos de células HEK293 co-transfectadas con RGl $\alpha$ 3 WT. Se realizaron registros de las corrientes glicinérgicas evocadas por glicina en distintas concentraciones (3-1500) para generar curvas de concentración respuestas (Figura 15A), donde se obtuvieron parámetros de EC<sub>50</sub> de 105  $\mu$ M para la condición de RGl $\alpha$ 3 WT.



**Figura 15: Curva concentración-respuesta de RGl $\alpha$ 3 WT en células HEK293.** (A) Gráfico de corrientes glicinérgicas normalizadas versus glicina (3-1500  $\mu$ M). (B) Gráfico del porcentaje de respuesta de los trazos representativos de la sensibilidad al agonista de glicina, en células HEK-293 co-expresando RGl $\alpha$ 3 WT y GFP como marcador de transfección positiva.

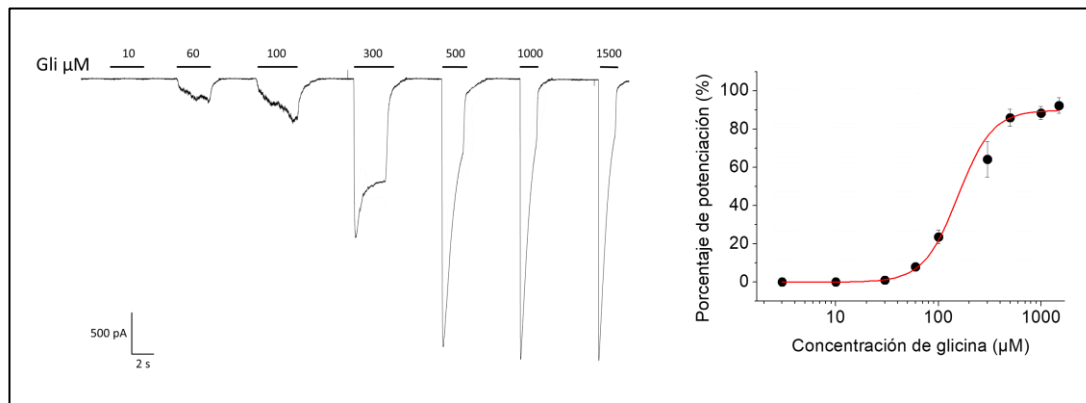
Para evaluar el efecto de la Alopregnanolona sobre la función del receptor de glicina, realizamos una coperfusión de una concentración de alopregnanolona creciente (0,05 – 2  $\mu\text{M}$ ), generando un aumento de las corrientes evocadas por glicina con un máximo de potenciación a los 2  $\mu\text{M}$  (Figura 16A). La alopregnanolona genera una potenciación de un máximo de 27% a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  (Figura 16B). Esto confirma que Alopregnanolona aumenta los registros obtenidos para RGLi  $\alpha 3$ . Así mismo, para corroborar los resultados obtenidos anteriormente de los experimentos de docking proteína-ligando y simulación de dinámica molecular, realizamos registros de electrofisiología en las mutantes RGLi  $\alpha 3$  W239Q y RGLi  $\alpha 3$  W239Q A303T.



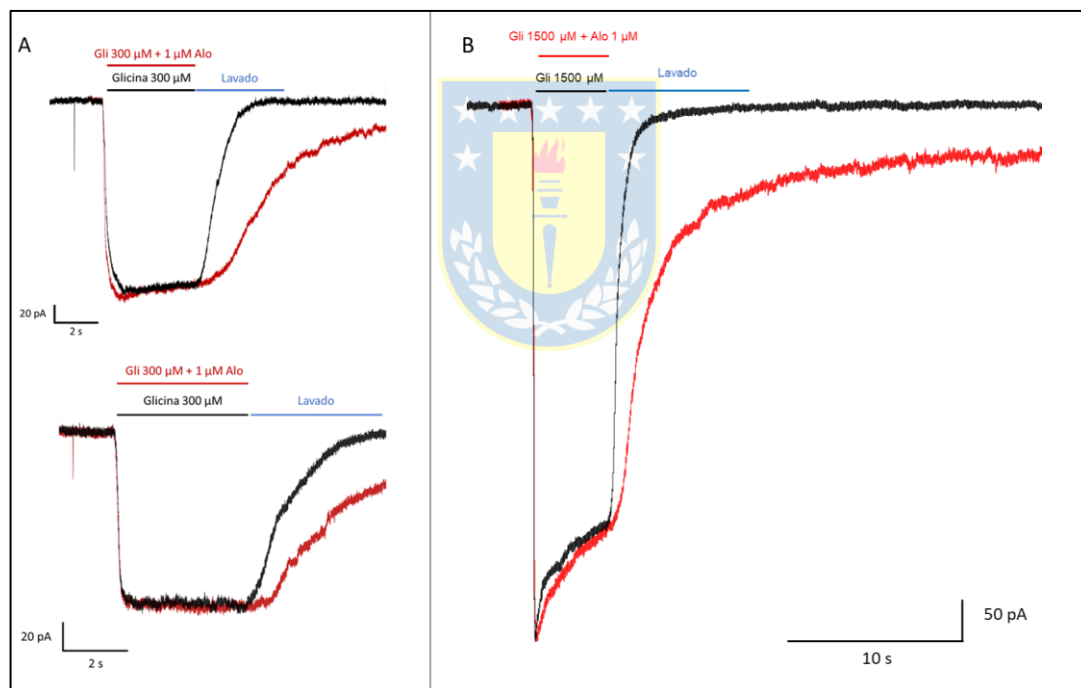
**Figura 16: Efecto de Alopregnanolona en la función de RGLi  $\alpha 3$  WT.** (A) Trazos representativos de corrientes evocadas por glicina (50  $\mu\text{M}$ ) junto con una concentración creciente de Alopregnanolona (0,1-2  $\mu\text{M}$ ). (B) Curva de concentración respuesta normalizada, para una concentración fija de glicina (50  $\mu\text{M}$ ) y creciente de Alo (0,1-2  $\mu\text{M}$ ).

## 6.5 Estudio de la función de RGLi $\alpha 3$ W239Q mediante técnicas de electrofisiología.

Para analizar la diferencia en la modulación de la función de RGLi  $\alpha 3$  WT e identificar el bolsillo de unión propuesto en los objetivos anteriores para Alopregnanolona, realizamos experimentos de patch clamp en modalidad de célula completa en cultivos de células HEK293 co-transfectadas con RGLi  $\alpha 3$  W239Q. Se realizaron nuevamente registros de las corrientes evocadas por glicina en distintas concentraciones crecientes (3-1500), generando una curva de concentración respuesta (Figura 17A). A partir de este análisis obtuvimos parámetros de  $EC_{50}$  de  $155,19 \pm 16,6 \mu M$ , con concentraciones saturantes de  $1500 \mu M$  (Figura 17B). Para evaluar el efecto de Alopregnanolona sobre RGLi  $\alpha 3$  W239Q, obtuvimos registros mediante una co-perfusión de una concentración de glicina ( $300 \mu M$ ) frente a una concentración de Alo ( $1 \mu M$ ) y una co-perfusión de una concentración saturante de glicina ( $1500 \mu M$ ) y Alo ( $1 \mu M$ ) (Figura 18). Se puede observar un aumento en el tiempo de deactivación de la corriente, donde a concentraciones saturantes se genera un efecto similar en el tiempo de desensibilización de RGLi  $\alpha 3$  W239Q (Figura 18A-B).



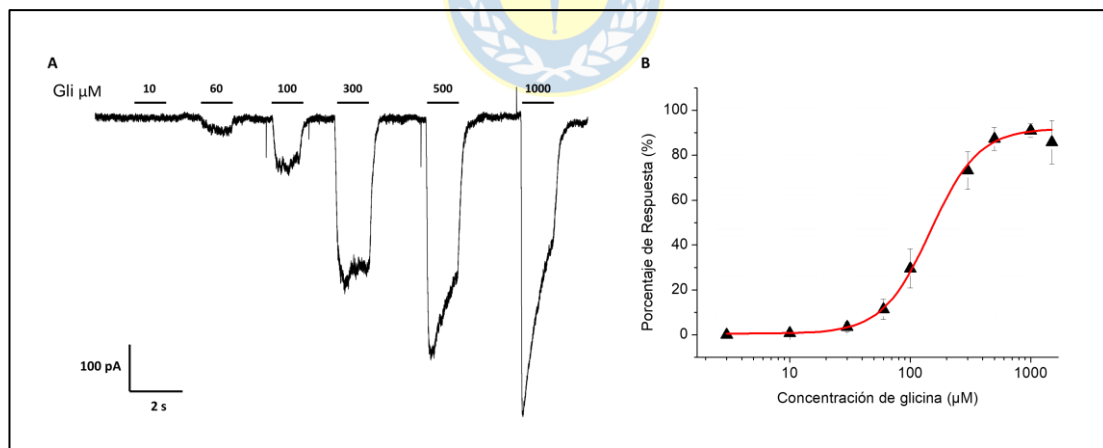
**Figura 17: Curva de concentración respuesta de RGLI  $\alpha 3$  W239Q en células HEK293.** (A) Trazos representativos de corrientes evocadas por concentraciones crecientes de glicina (3-1500  $\mu\text{M}$ ). (B) Gráfico del porcentaje de respuesta de los trazos representativos de la sensibilidad al agonista de glicina para RGLI  $\alpha 3$  W239Q.



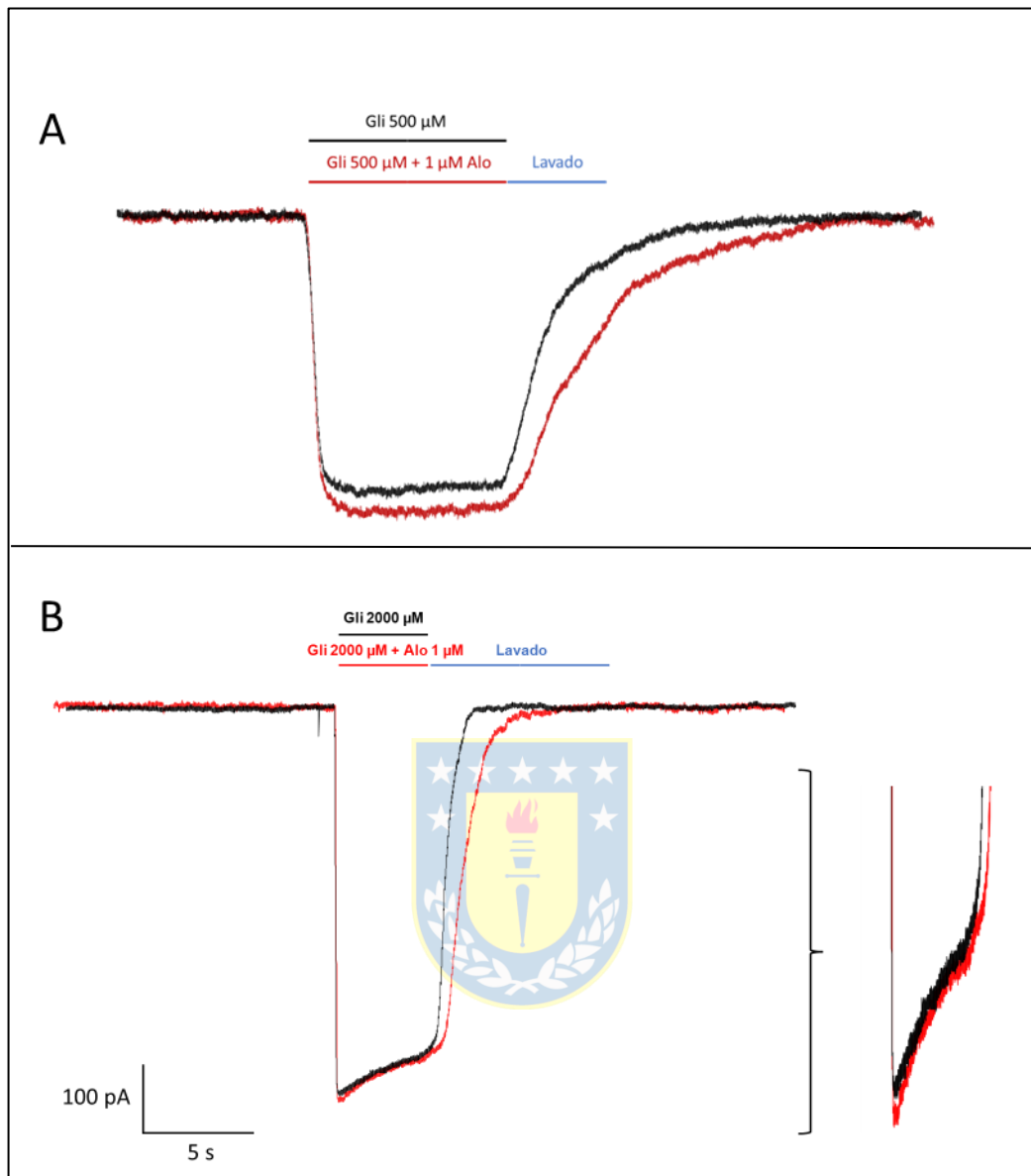
**Figura 18: Efecto de Alopregnanolona en la actividad de RGLI  $\alpha 3$  W239Q.** (A) Trazos representativos de dos corrientes evocadas por glicina (300  $\mu\text{M}$ ) con una co-perfusión de Alo (1  $\mu\text{M}$ ) durante 4 segundos. (B) Trazos representativos de una corriente evocada por glicina (1500  $\mu\text{M}$ ) con una co-perfusión de Alo (1  $\mu\text{M}$ ) durante 4 segundos).

## 6.6 Estudio de la función de RGlI $\alpha 3$ W239Q A303T mediante técnicas de electrofisiología.

Para evaluar la diferencia entre la presencia de los residuos Q239 y T303 en el bolsillo de unión, realizamos registros de electrofisiología para RGlI  $\alpha 3$  W239Q A303T. Mediante registros en la modalidad de célula completa, corrientes glicinérgicas fueron evocadas por glicina, obteniendo un patrón similar a los registros de los objetivos anteriores (Figura 19A), con parámetros de  $EC_{50}$  de  $147,38 \pm 24,8 \mu M$  (Figura 19B). Además, se evaluó la modulación por Alopregnanolona ( $1 \mu M$ ) frente a una concentración fija de glicina  $500 \mu M$  (Figura 20A) y una saturante de  $1000 \mu M$  (Figura 20B), donde se ve un cambio en la amplitud de la corriente, y en el proceso de desensibilización del receptor, similar al caso de los registros obtenidos para RGlI  $\alpha 3$  W239Q.



**Figura 19: Curva de concentración respuesta de RGlI  $\alpha 3$  W239Q A303T en células HEK293.** (A) Trazos representativos de corrientes evocadas por concentraciones crecientes de glicina (3-1500  $\mu M$ ). (B) Gráfico del porcentaje de respuesta de los trazos representativos de la sensibilidad al agonista de glicina para RGlI  $\alpha 3$  W239Q A303T.



**Figura 20: Efecto de Alopregnanolona en la función de RGLI  $\alpha$ 3 W239Q A303T.**  
 (A) Trazos representativos de corrientes evocadas por glicina (500  $\mu$ M) con una co-perfusión de Alo (1  $\mu$ M). (B) Trazos representativos de las corrientes glicinérgicas evocadas por glicina (2000  $\mu$ M) frente a una co-perfusión con Alo (1  $\mu$ M).

## 8. DISCUSIÓN

Alopregnanolona es un neuroesteroide, caracterizado por su participación en trastornos del comportamiento como la ansiedad y la depresión (Boero et al., 2019; Naylor et al., 2010; Sripada et al., 2014), empleado actualmente en el campo clínico para el tratamiento de la depresión post-parto (Meltzer-Brody & Kaner, 2020). Tradicionalmente, el mecanismo por el cual Alo afecta a la excitabilidad neuronal ha sido asociado a la modulación de la función de receptores de la familia pLGICs (Chase Matthew & Doodipala Samba, 2013; Drexler et al., 2020). Dado que la excitabilidad de núcleos neuronales como acumbens y estriado está relacionada con la generación de trastornos del comportamiento (Delaney et al., 2010; Jonsson et al., 2009; McCracken et al., 2017), la familia pLGIC ha ganado un particular interés como blanco terapéutico. Registros de electrofisiología demuestran la modulación de Alo sobre la función del receptor de GABA<sub>A</sub>R (Belelli & Lambert, 2005), que comparte una similitud estructural y funcional con RGli. Avances similares, demuestran que la función del receptor de glicina es modulada por otros compuestos neuroesteroidales similares a Alo como THDOC y PREG, efecto descrito para RGli  $\alpha$ 1 y RGli  $\alpha$ 2 disminuyendo o potenciando su función (Maksay et al., 2001; Weir et al., 2004). Estudios *in silico* sugieren una interacción entre el complejo de RGli- $\alpha$ 3 unido a ivermectina con Alo (Alvarez & Pecci, 2019), sin embargo, la modulación de

RGli  $\alpha 3$  por Alo no ha sido descrita. En este contexto, en este trabajo de tesis investigamos la modulación de la función del RGli  $\alpha 3$  por Alopregnanolona, dilucidando su bolsillo de unión.

### **Estudio in silico de la interacción de RGli $\alpha 3$ con Alo**

En nuestros resultados, pudimos observar que al realizar el docking proteína-ligando, el screening de compuestos neuroesteroidales sobre el TMD de RGli  $\alpha 3$ , solo fueron obtenidos en la conformación abierta del receptor, así no en su conformación cerrada. Estudios previos, mostraron que el TMD de los receptores de la familia pLGICs es crítica para la unión de compuestos neuroesteroidales como Alo, THDOC y PREG-S (Budelier et al., 2019; Chen et al., 2019; Cheng et al., 2018). Esto puede deberse al esqueleto esteroide que poseen los neuroesteroides, y sus propiedades fisicoquímicas, lo que favorece al ligando neuroesteroide a tener su bolsillo de unión en una región hidrofóbica (Budelier et al., 2019). Por ejemplo, en estructuras cristalográficas para el RGABA<sub>A</sub> y Ns tiene su bolsillo de unión en el TMD de su estructura (Miller et al., 2017; Sugawara et al., n.d.).

En cuanto al complejos obtenidos para cada estos compuestos, podemos ver que su posicionamiento radica en el TMD del receptor, con una localización y orientación inter-subunidad con el TM1 y TM3 como principal posible sitio de unión. En nuestro caso, podemos ver que los compuestos que no están sulfatados como Alo, 3 $\alpha$ -Diol y THDOC comparten un sitio similar en el TM1-TM3, mientras que PREG-S y DHEA-S tienen una posición con el TM4 la cual



se encuentra en la región más expuesta a los fosfolípidos. Sin embargo, no podemos descartar el rol de los fosfolípidos y la diferencia en su composición dentro de este bolsillo (Dämgen & Biggin, 2021; Kumar et al., 2020). Futuros experimentos en este sentido son necesarios para confirmar la participación de los fosfolípidos dentro de esta región crítica del receptor de glicina.

Asimismo, dentro de los resultados de docking proteína-ligando, al comparar los sitios de unión para Alo, 3 $\alpha$ -Diol y THDOC, estos comparten una región similar, compartiendo ciertos enlaces generados, con un mayor porcentaje de interacciones hidrofóbicas mediadas por W243 y un puente de hidrógeno mediado por agua con R327. Estos residuos han sido reportados como clave para la potenciación de Alo sobre la función del RGABA<sub>A</sub>, donde mutaciones sitio dirigidas para W243, F306 y L310 disminuyen la afinidad de Alo en el bolsillo de unión (Miller et al., 2017; Sugawara et al., n.d.). De esta manera, nuestros complejos comparten una similitud, sin embargo, difieren en ciertas interacciones claves, mediadas principalmente por Q239 y T303, las cuales son diferentes en el alineamiento múltiple de secuencias, donde RGABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 5 poseen estos residuos (Miller et al., 2017). Por otra parte, los complejos formados con los compuestos sulfatados como PREG-S y THDOC-S presentan una posición y orientación hacia el TM4, lo que podría sugerir una diferencia en la modulación de la función del RGl $\alpha$ 3, debido a que, registros de electrofisiología para RGl $\alpha$ 1 demuestran un efecto inhibitorio para los compuestos sulfatados, (Maksay et al., 2001).

Posteriormente, mediante las simulaciones de dinámica molecular utilizando los complejos obtenidos anteriormente generamos proyecciones de 500 ns para visualizar y reportar una diferencia a nivel del TMD de nuestros complejos. Dentro de las dos simulaciones de dinámica molecular, ambas presentan un RMSD sin oscilaciones significativas, lo que indica la estabilidad de los complejos generados a lo largo de la proyección. Principalmente, dentro de las interacciones principales encontramos a W239 y R327 con un puente de hidrógeno mediado por agua, el cual sugiere que ambos residuos son críticos en el bolsillo de unión para Alo. Cabe destacar que durante la DM para RGli  $\alpha 3$ , estos puentes de hidrógeno mediados por agua solo representan el 40% de la interacción total de estos aminoácidos con el esqueleto de Alo, teniendo un carácter no menos importante de interacciones hidrofóbicas, donde W243 forma parte de esta. De igual manera, estudios reportados para el dominio transmembrana del receptor GLIC con compuestos neuroesteroidales, estos residuos de W243, W239 y F306 son críticos en el bolsillo de unión con Alo (Cheng et al., 2018). De la misma manera, se observaron otros residuos aminoacídicos importante los cuales tienen un carácter hidrofóbico como F306, A302 y A303. Estas observaciones son coherentes con nuestros complejos obtenidos anteriormente, donde los principales aminoácidos se encuentran presentes.

Por otra parte, al realizar la mutación de los residuos W239Q y A303T, se genera una interacción de puentes de hidrógeno, los cuales se mantienen durante la proyección de la DM. Dentro de estos residuos, estos sugieren un

aumento en el tiempo de interacción y movimiento a nivel del TMD, ya que dentro de los residuos postulados como crítico para la conformación desensibilizada del RGli, se mantiene a un radio de 1.4 Å, a diferencia de RGli  $\alpha 3$  WT el cual se mantiene en 0,83 Å, lo que sugiere un movimiento mayoritariamente a nivel de la prolina 250 el cual podría sugerir un efecto en la desensibilización del receptor. Esta región ha sido reportada como crucial en la conformación desensibilizada del RGli (Yu et al., 2021), lo que reafirman nuestras predicciones, y sugieren que estos residuos afectan a nivel del TMD del receptor, lo que analizamos mediante registros de electrofisiología.

**Estudio de la modulación de RGli  $\alpha 3$  WT, RGli  $\alpha 3$  W239Q y RGli  $\alpha 3$  W239Q A303T con alopregnanolona mediante técnicas electrofisiológicas en células HEK293.**

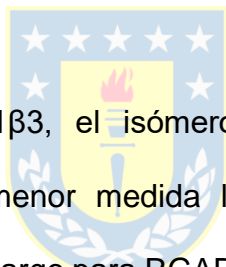


Dentro de nuestros resultados, podemos ver que la función del RGli  $\alpha 3$  es levemente potenciada por Alo a concentraciones de 1-2  $\mu\text{M}$ . El aumento del amperaje registrado puede deberse principalmente a la interacción de Alo, dentro del cual se encuentra nuestro modelo propuesto de interacción *in silico*. Sin embargo, no hubo mayor efecto a nivel de la desensibilización del receptor. Dentro de los registros electrofisiológicos reportados para Alo y RGABA<sub>A</sub> vemos un efecto diferente a nivel de las subunidades que conforman al receptor, siendo las  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$  las más estudiadas, debido a su efecto en la desensibilización del receptor (Miller et al., 2017; Weir et al., 2004b). Sin embargo, dentro de la modulación del RGli  $\alpha 1$ , se postula que Alo, de manera

similar a nuestros resultados, también potencia la función del receptor (Maksay et al., 2001; Weir et al., 2004b). Por otra parte, similar con nuestros resultados, otros experimentos a nivel de neuronas hipocampales y de la médula espinal, en corrientes de desensibilización del receptor (Bukanova et al., 2020) lo que sugiere un efecto mayor a nivel del tiempo y probabilidad de apertura del receptor. Futuros experimentos podrían indicar las propiedades cinéticas en las que Alo afecta.

Al generar las mutaciones para RGLi  $\alpha 3$  W239Q y RGLi  $\alpha 3$  W239Q A303T se evidencia un desplazamiento de la  $EC_{50}$  del receptor frente a glicina. En este contexto, esto puede surgir debido al cambio de estos residuos que se encuentran en una región crítica del receptor, la cual es el TMD. Estudios previos de mutación sitio-dirigida para RGLi reportan, que la mutación de otros residuos que están próximos a la región inferior del TMD, generan un cambio significativo en su  $EC_{50}$  (Acuña et al., 2016; Moraga-Cid et al., 2020), lo que podría explicar su desplazamiento. Asimismo, los registros obtenidos para las mutantes RGLi  $\alpha 3$  W239Q y RGLi  $\alpha 3$  W239Q A303T, reportan un cambio funcional a nivel del paso del receptor desde su conformación abierta a la cerrada. Esto puede deberse a que la Alo estabiliza la conformación abierta del receptor, por lo que mantiene a RGLi  $\alpha 3$  en su estado abierto, lo que se refleja en el aumento del tiempo de la de-activación de la corriente registrada. En este contexto se han descrito residuos clave en el TM2 que participan en la conformación cerrada del receptor como 9´Leucina (posición 9 en TM2) y 2´Prolina que es crucial en el estado desensibilizado del receptor. (Lape et al.,

2012; Yu et al., 2021; Zhu, 2022). Así mismo, registros de electrofisiología en el  $RGABA_A \alpha 1\beta 3\gamma 2$  muestran que la mutación de L297A y F301 en la subunidad  $\beta 3$  redujo la potenciación de Alo (Miller et al., 2017), residuos que se encuentran presentes en el  $RGli \alpha 3$ , cerca de la 2ª Prolina en el TM2. Por otra parte, también se reportó un bolsillo de unión para Alo en una región superior del TMD en el  $RGABA_A \alpha 1\beta 3$ , donde la mutación de V227 produjo una inhibición significativa para Alo en la amplitud de la corriente (Chen et al., 2019). Esto sugiere que el ligando de Alo actúa en una región crítica del receptor, la cual participa en el proceso de desensibilización, donde las interacciones de W239 y A303 afectan a este punto de constricción para el paso de aniones de cloruro.



Asimismo, para  $RGABA_A \alpha 1\beta 3$ , el isómero de Alo, correspondiente a Pregnanolona potencia en menor medida la actividad de este receptor (Tateiwa et al., 2023). Sin embargo para  $RGABA_\rho$  Pregnanolona disminuye la actividad de las corrientes registradas, actuando como un modulador alostérico negativo (Li et al., 2006). Esto indica la importancia de las distintas subunidades que componen a cada receptor, ya que dentro de las subunidad  $RGli \alpha 3$  y  $RGABA_\rho$  se encuentran los mismos residuos como W239, W243 y A303, donde en ambos casos Pregnanolona disminuye las corrientes registradas (Jiang et al., 2006). Esto puede deberse a la diferencia en el posicionamiento del ligando por sobre su bolsillo de unión y la falta de residuos como Q239 y T303 para generar un posible efecto potenciador, sin embargo,

futuros experimentos de mutagénesis sitio-dirigida podrían caracterizar la diferencia de unión con Pregnanolona para RGlI  $\alpha$ 3 y RGABA $\rho$ .



## 9. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que Alopregnanolona, ejerce un efecto en la función del RGlI  $\alpha 3$  a nivel del TMD. Dentro de nuestros hallazgos *in silico*, la diferencia de los residuos a nivel del TMD sugieren un cambio significativo en el perfil farmacológico frente a compuestos neuroesteroidales, donde las interacciones hidrofóbicas son mayoritarias. Finalmente, nuestros resultados electrofisiológicos, mostraron que, pesar de no tener un efecto significativo a nivel de la potenciación del receptor, nuestros registros de electrofisiología sugieren que los residuos W239 y A303 inciden en el paso de la conformación abierta del receptor a una cerrada. Futuros experimentos en sistemas que expresen a las diferentes subunidades del RGlI contribuirán a definir si esta región es crítica en la unión de moduladores alostéricos que tengan un efecto a nivel de la de-activación de su función.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, M. A., Yévenes, G. E., Ralvenius, W. T., Benke, D., Lio, A. D., Lara, C. O., Muñoz, B., Burgos, C. F., Moraga-Cid, G., Corringier, P.-J., & Zeilhofer, H. U. (2016). Phosphorylation state-dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(7), 2547–2560. <https://doi.org/10.1172/JCI83817>
2. Agís-Balboa, R. C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., & Guidotti, A. (2006). Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(39), 14602–14607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606544103>
3. Ahrens, J., Leuwer, M., Demir, R., Krampfl, K., Foadi, N., & Haeseler, G. (2008). The Anaesthetic Steroid Alphaxalone Positively Modulates  $\alpha$ 1-Glycine Receptor Function. *Pharmacology*, *82*(3), 228–232. <https://doi.org/10.1159/000156489>
4. Aldred, S., & Mecocci, P. (2010). Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, *51*(1), e16-18. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2009.07.001>
5. Alexander, S. P., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., Aldrich, R. W., Becirovic, E., Biel, M., Catterall, W. A., Conner, A. C., Davies, P., ... Zhu, M. (2019). THE CONCISE



- GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 176(Suppl 1), S142–S228. <https://doi.org/10.1111/bph.14749>
6. Arnold, A. P., & Breedlove, S. M. (1985). Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: A reanalysis. *Hormones and Behavior*, 19(4), 469–498. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(85\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0018-506X(85)90042-X)
  7. Asari, H., & Meister, M. (2012). Divergence of visual channels in the inner retina. *Nature Neuroscience*, 15(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nn.3241>
  8. Bae, J. Y., Lee, J. S., Ko, S. J., Cho, Y. S., Rah, J.-C., Cho, H. J., Park, M. J., & Bae, Y. C. (2018). Extrasynaptic homomeric glycine receptors in neurons of the rat trigeminal mesencephalic nucleus. *Brain Structure & Function*, 223(5), 2259–2268. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1607-3>
  9. Bae, J. Y., Mah, W., Rah, J.-C., Park, S. K., & Bae, Y. C. (2016). Expression of glycine receptor alpha 3 in the rat trigeminal neurons and central boutons in the brainstem. *Brain Structure & Function*, 221(9), 4601–4613. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1190-4>
  10. Bergstrom, H. C., Lieberman, A. G., Graybeal, C., Lipkin, A. M., & Holmes, A. (2020). Dorsolateral striatum engagement during reversal learning. *Learning & Memory*, 27(10), 418–422. <https://doi.org/10.1101/lm.051714.120>
  11. Bode, A., & Lynch, J. W. (2014). The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Molecular Brain*, 7(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-2>
  12. Boero, G., Porcu, P., & Morrow, A. L. (2019). Pleiotropic actions of allopregnanolone underlie therapeutic benefits in stress-related disease. *Neurobiology of Stress*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100203>

13. Bowers, K. J., Chow, D. E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., Klepeis, J. L., Kolossvary, I., Moraes, M. A., Sacerdoti, F. D., Salmon, J. K., Shan, Y., & Shaw, D. E. (2006). Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*, 43–43. <https://doi.org/10.1109/SC.2006.54>
14. Budelier, M. M., Cheng, W. W. L., Chen, Z.-W., Bracamontes, J. R., Sugasawa, Y., Kathiresan, K., Mydock-McGrane, L., Covey, D. F., & Evers, A. S. (2019). Common binding sites for cholesterol and neurosteroids on a pentameric ligand-gated ion channel. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.11.005>
15. Bukanova, J. V., Solntseva, E. I., & Kudova, E. (2020). Neurosteroids as Selective Inhibitors of Glycine Receptor Activity: Structure-Activity Relationship Study on Endogenous Androstanes and Androstenes. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00044>
16. Cerdan, A. H., Sisquellas, M., Pereira, G., Barreto Gomes, D. E., Changeux, J.-P., & Cecchini, M. (2020). The Glycine Receptor Allosteric Ligands Library (GRALL). *Bioinformatics*, 36(11), 3379–3384. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa170>
17. Chen, Z.-W., Bracamontes, J. R., Budelier, M. M., Germann, A. L., Shin, D. J., Kathiresan, K., Qian, M.-X., Manion, B., Cheng, W. W. L., Reichert, D. E., Akk, G., Covey, D. F., & Evers, A. S. (2019). Multiple functional neurosteroid binding sites on GABAA receptors. *PLoS Biology*, 17(3), e3000157. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000157>

18. Cheng, W. W. L., Chen, Z.-W., Bracamontes, J. R., Budelier, M. M., Krishnan, K., Shin, D. J., Wang, C., Jiang, X., Covey, D. F., Akk, G., & Evers, A. S. (2018). Mapping two neurosteroid-modulatory sites in the prototypic pentameric ligand-gated ion channel GLIC. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(8), 3013–3027. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000359>
19. Colciago, A., Bonalume, V., Melfi, V., & Magnaghi, V. (2020). Genomic and Non-genomic Action of Neurosteroids in the Peripheral Nervous System. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00796>
20. Corpéchet, C., Leclerc, P., Baulieu, E.-E., & Brazeau, P. (1985). Neurosteroids: Regulatory mechanisms in male rat brain during heterosexual exposure. *Steroids*, *45*(3), 229–234. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(85\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0039-128X(85)90072-8)
21. Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *28*(7), 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>
22. Dämgen, M. A., & Biggin, P. C. (2021). State-dependent protein-lipid interactions of a pentameric ligand-gated ion channel in a neuronal membrane. *PLoS Computational Biology*, *17*(2), e1007856. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007856>
23. Dawson, A., Trumper, P., de Souza, J. O., Parker, H., Jones, M. J., Hales, T. G., & Hunter, W. N. (2019). Engineering a surrogate human heteromeric  $\alpha/\beta$  glycine receptor orthosteric site exploiting the structural homology and stability of acetylcholine-binding protein. *IUCrJ*, *6*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1107/S205225251901114X>

24. Delaney, A. J., Esmaeili, A., Sedlak, P. L., Lynch, J. W., & Sah, P. (2010). Differential expression of glycine receptor subunits in the rat basolateral and central amygdala. *Neuroscience Letters*, 469(2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.003>
25. Deleuze, C., Runquist, M., Orcel, H., Rabié, A., Dayanithi, G., Alonso, G., & Hussy, N. (2005). Structural difference between heteromeric somatic and homomeric axonal glycine receptors in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Neuroscience*, 135(2), 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.024>
26. Dorota Majewska, M., & Schwartz, R. D. (1987). Pregnenolone-sulfate: An endogenous antagonist of the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Research*, 404(1), 355–360. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91394-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91394-1)
27. Droogleever Fortuyn, H. A., van Broekhoven, F., Span, P. N., Bäckström, T., Zitman, F. G., & Verkes, R. J. (2004). Effects of PhD examination stress on allopregnanolone and cortisol plasma levels and peripheral benzodiazepine receptor density. *Psychoneuroendocrinology*, 29(10), 1341–1344. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.02.003>
28. Du, J., Lü, W., Wu, S., Cheng, Y., & Gouaux, E. (2015). Glycine receptor mechanism illuminated by electron cryo-microscopy. *Nature*, 526(7572), 224–229. <https://doi.org/10.1038/nature14853>
29. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>

30. Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1481–1489. <https://doi.org/10.1038/nn1579>
31. Fodor, L., Boros, A., Dezső, P., & Maksay, G. (2006). Expression of heteromeric glycine receptor-channels in rat spinal cultures and inhibition by neuroactive steroids. *Neurochemistry International*, 49(6), 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.04.013>
32. Förster, B., Muñoz, B., Lobo, M. K., Chandra, R., Lovinger, D. M., & Aguayo, L. G. (2017). Presence of ethanol-sensitive glycine receptors in medium spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *The Journal of Physiology*, 595(15), 5285–5300. <https://doi.org/10.1113/JP273767>
33. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., & Mainz, D. T. (2006). Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177–6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
34. Fritschy, J.-M., Harvey, R. J., & Schwarz, G. (2008). Gephyrin: Where do we stand, where do we go? *Trends in Neurosciences*, 31(5), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.02.006>
35. Gamlin, C. R., Yu, W.-Q., Wong, R. O. L., & Hoon, M. (2018). Assembly and maintenance of GABAergic and Glycinergic circuits in the mammalian nervous system. *Neural Development*, 13. <https://doi.org/10.1186/s13064-018-0109-6>
36. Gielen, M., & Corringer, P. (2018). The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *The Journal of Physiology*, 596(10), 1873–1902. <https://doi.org/10.1113/JP275100>

37. Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>
38. 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). GlyR  $\alpha 3$ : An Essential Target for Spinal PGE2-Mediated Inflammatory Pain Sensitization. *Science*, *304*(5672), 884–887. <https://doi.org/10.1126/science.1094925>
39. Harvey, V. L., Caley, A., Müller, U. C., Harvey, R. J., & Dickenson, A. H. (2009). A selective role for  $\alpha 3$  subunit glycine receptors in inflammatory pain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *2*. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.014.2009>
40. Hawes, S. L., Evans, R. C., Unruh, B. A., Benkert, E. E., Gillani, F., Dumas, T. C., & Blackwell, K. T. (2015). Multimodal Plasticity in Dorsal Striatum While Learning a Lateralized Navigation Task. *Journal of Neuroscience*, *35*(29), 10535–10549.
41. Hong, J.-S., Cho, J.-H., Choi, I.-S., Lee, M.-G., & Jang, I.-S. (2013). Pregnenolone sulfate modulates glycinergic transmission in rat medullary dorsal horn neurons. *European Journal of Pharmacology*, *712*(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.039>
42. Huang, X., Chen, H., & Shaffer, P. L. (2017). Crystal Structures of Human GlyR $\alpha 3$  Bound to Ivermectin. *Structure*, *25*(6), 945-950.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.04.007>

43. Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Xiang, Z., & Honig, B. (2002). On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-chain Conformations. *Journal of Molecular Biology*, *320*(3), 597–608. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00470-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00470-9)
44. Jacobson, M. P., Pincus, D. L., Rapp, C. S., Day, T. J. F., Honig, B., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2004). A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *55*(2), 351–367. <https://doi.org/10.1002/prot.10613>
45. Jiang, P., Yang, C.-X., Wang, Y.-T., & Xu, T.-L. (2006). Mechanisms of modulation of pregnanolone on glycinergic response in cultured spinal dorsal horn neurons of rat. *Neuroscience*, *141*(4), 2041–2050. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.05.009>
46. Jo, D. H., Abdallah, M. A., Young, J., Baulieu, E. E., & Robel, P. (1989). Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and their sulfate and fatty acid esters in the rat brain. *Steroids*, *54*(3), 287–297. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(89\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0039-128x(89)90003-2)
47. Jonsson, S., Kerekes, N., Hyytiä, P., Ericson, M., & Söderpalm, B. (2009). Glycine receptor expression in the forebrain of male AA/ANA rats. *Brain Research*, *1305*, S27–S36. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.053>
48. Kallen, C. B., Billheimer, J. T., Summers, S. A., Stayrook, S. E., Lewis, M., & Strauss, J. F. (1998). Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Is A Sterol Transfer Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(41), 26285–26288. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26285>
49. Kaner, S., Colquhoun, H., Gunduz-Bruce, H., Raines, S., Arnold, R., Schacterle, A., Doherty, J., Epperson, C. N., Deligiannidis, K. M., Riesenberger, R., Hoffmann, E., Rubinow, D., Jonas, J., Paul, S., & Meltzer-Brody, S. (2017).

Brexanolone (SAGE-547 injection) in post-partum depression: A randomised controlled trial. *The Lancet*, 390(10093), 480–489. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31264-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31264-3)

50. Kumar, A., Basak, S., Rao, S., Gicheru, Y., Mayer, M. L., Sansom, M. S. P., & Chakrapani, S. (2020). Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in lipid nanodiscs. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17364-5>
51. Kumar, A., Kindig, K., Rao, S., Zaki, A.-M., Basak, S., Sansom, M. S. P., Biggin, P. C., & Chakrapani, S. (2022). Structural basis for cannabinoid-induced potentiation of alpha1-glycine receptors in lipid nanodiscs. *Nature Communications*, 13, 4862. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32594-5>
52. Lape, R., Plested, A. J. R., Moroni, M., Colquhoun, D., & Sivilotti, L. G. (2012). The  $\alpha 1K276E$  Startle Disease Mutation Reveals Multiple Intermediate States in the Gating of Glycine Receptors. *Journal of Neuroscience*, 32(4), 1336–1352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4346-11.2012>
53. Lavaque, E., Mayen, A., Azcoitia, I., Tena-Sempere, M., & Garcia-Segura, L. M. (2006). Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450scc, and aromatase in the olivocerebellar system. *Journal of Neurobiology*, 66(3), 308–318. <https://doi.org/10.1002/neu.20221>
54. Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 58(5–6), 760–793. <https://doi.org/10.1007/pl00000899>
55. Li, W., Covey, D. F., Alakoskela, J.-M., Kinnunen, P. K. J., & Steinbach, J. H. (2006). Enantiomers of Neuroactive Steroids Support a Specific Interaction



- with the GABA-C Receptor as the Mechanism of Steroid Action. *Molecular Pharmacology*, 69(6), 1779–1782. <https://doi.org/10.1124/mol.106.022863>
56. Li, W., Zuo, W., Wu, W., Zuo, Q. K., Fu, R., Wu, L., Zhang, H., Ndukwe, M., & Ye, J.-H. (2019). Activation of glycine receptors in the lateral habenula rescues anxiety- and depression-like behaviors associated with alcohol withdrawal and reduces alcohol intake in rats. *Neuropharmacology*, 157, 107688. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107688>
57. Liu, Q., & Wong-Riley, M. T. T. (2013). Postnatal development of glycine receptor subunits  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , and  $\beta$  immunoreactivity in multiple brain stem respiratory-related nuclear groups of the rat. *Brain Research*, 1538. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.028>
58. Lloyd-Evans, E., & Waller-Evans, H. (2020). Biosynthesis and signalling functions of central and peripheral nervous system neurosteroids in health and disease. *Essays in Biochemistry*, 64(3), 591–606. <https://doi.org/10.1042/EBC20200043>
59. Longone, P., di Michele, F., D'Agati, E., Romeo, E., Pasini, A., & Rupprecht, R. (2011). Neurosteroids as Neuromodulators in the Treatment of Anxiety Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00055>
60. Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2010). A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. *International Journal for Parasitology*, 40(13), 1477–1481. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.07.010>
61. Lynch, J. W. (2004). Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiological Reviews*, 84(4), 1051–1095. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2003>

62. Lynch, J. W., Zhang, Y., Talwar, S., & Estrada-Mondragon, A. (2017). Glycine Receptor Drug Discovery. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 79, 225–253. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.01.003>
63. Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W276–W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>
64. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
65. Maksay, G., Laube, B., & Betz, H. (2001). Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids. *Neuropharmacology*, 41(3), 369–376. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00071-5)
66. Malosio, M. L., Marquèze-Pouey, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1991). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *The EMBO Journal*, 10(9), 2401–2409. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07779.x>
67. Mascia, M. P., Mihic, S. J., Valenzuela, C. F., Schofield, P. R., & Harris, R. A. (1996). A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine-sensitive glycine receptors. *Molecular Pharmacology*, 50(2), 402–406.
68. McCool, B. A., & Farroni, J. S. (2001). Subunit Composition of Strychnine-sensitive Glycine Receptors Expressed by Adult Rat Basolateral Amygdala Neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 14(7), 1082–1090.

69. 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). Glycine receptor  $\alpha 3$  and  $\alpha 2$  subunits mediate tonic and exogenous agonist-induced currents in forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(34), E7179–E7186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703839114>
70. Meltzer-Brody, S., & Kaner, S. J. (2020). Allopregnanolone in postpartum depression: Role in pathophysiology and treatment. *Neurobiology of Stress*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100212>
71. Mesuret, G., Dannenberg, J., Arnoldt, M., Grützner, A.-A., Niebert, M., & Hülsmann, S. (2018). Breathing disturbances in a model of Rett syndrome: A potential involvement of the glycine receptor  $\alpha 3$  subunit? *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 248, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.11.011>
72. Miller, P. S., Scott, S., Masiulis, S., De Colibus, L., Pardon, E., Steyaert, J., & Aricescu, A. R. (2017). Structural basis for GABAA receptor potentiation by neurosteroids. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3484>
73. Moraga-Cid, G., San Martín, V. P., Lara, C. O., Muñoz, B., Marileo, A. M., Sazo, A., Muñoz-Montesino, C., Fuentealba, J., Castro, P. A., Guzmán, L., Burgos, C. F., Zeilhofer, H. U., Aguayo, L. G., Corringier, P.-J., & Yévenes, G. E. (2020). Modulation of glycine receptor single-channel conductance by intracellular phosphorylation. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61677-w>
74. Naylor, J. C., Kilts, J. D., Hulette, C. M., Steffens, D. C., Blazer, D. G., Ervin, J. F., Strauss, J. L., Allen, T. B., Massing, M. W., Payne, V. M., Youssef, N.

- A., Shampine, L. J., & Marx, C. E. (2010). Allopregnanolone Levels are Reduced in Temporal Cortex in Patients with Alzheimer's Disease Compared to Cognitively Intact Control Subjects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(8), 951–959. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.006>
75. Nemezc, Á., Prevost, M. S., Menny, A., & Corringer, P.-J. (2016). 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>
76. Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and Memory Functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25(1), 563–593. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937>
77. Peña-Varas, C., & Ramírez, D. (2021). *Docking post-processing: Interaction frequency among single-cluster conformers*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4742721>
78. Pilorge, M., Fassier, C., Le Corronc, H., Potey, A., Bai, J., De Gois, S., Delaby, E., Assouline, B., Guinchat, V., Devillard, F., Delorme, R., Nygren, G., Råstam, M., Meier, J., Otani, S., Cheval, H., James, V., Topf, M., Dear, N., ... Betancur, C. (2016). Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Molecular Psychiatry*, 21(7), 936–945. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.139>
79. Pistis, M., Belelli, D., Peters, J. A., & Lambert, J. J. (1997). The interaction of general anaesthetics with recombinant GABAA and glycine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes: A comparative study. *British Journal of Pharmacology*, 122(8), 1707–1719. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701563>
80. Porcu, P., Barron, A. M., Frye, C. A., Walf, A. A., Yang, S.-Y., He, X.-Y., Morrow, A. L., Panzica, G. C., & Melcangi, R. C. (2016). Neurosteroidogenesis

today: Novel targets for neuroactive steroid synthesis and action and their relevance for translational research. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(2). <https://doi.org/10.1111/jne.12351>

81. Ruiz-Gómez, A., García-Calvo, M., Vázquez, J., Marvizón, J. C. G., Valdivieso, F., & Mayor, F. (1989). Thermodynamics of Agonist and Antagonist Interaction with the Strychnine-Sensitive Glycine Receptor. *Journal of Neurochemistry*, 52(6), 1775–1780. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07256.x>
82. Sadek, B., Oz, M., Nurulain, S. M., Jayaprakash, P., Latacz, G., Kieć-Kononowicz, K., & Szymańska, E. (2017). Phenylalanine derivatives with modulating effects on human  $\alpha$ 1-glycine receptors and anticonvulsant activity in strychnine-induced seizure model in male adult rats. *Epilepsy Research*, 138, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.eplesyres.2017.05.008>
83. Samarut, E., Chalopin, D., Riché, R., Allard, M., Liao, M., & Drapeau, P. (2019). Individual knock out of glycine receptor alpha subunits identifies a specific requirement of glra1 for motor function in zebrafish. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216159>
84. San Martín, V. P., Burgos, C. F., Marileo, A. M., Lara, C. O., Sazo, A., Fuentealba, J., Guzmán, L., Castro, P. A., Aguayo, L. G., Moraga-Cid, G., & Yévenes, G. E. (2019). Inhibitory Actions of Tropeines on the  $\alpha$ 3 Glycine Receptor Function. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00331>
85. Sánchez-Chávez, G., Velázquez-Flores, M. Á., Ruiz Esparza-Garrido, R., & Salceda, R. (2017). Glycine receptor subunits expression in the developing rat retina. *Neurochemistry International*, 108, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.03.013>

86. Schwienbacher, I., Fendt, M., Richardson, R., & Schnitzler, H.-U. (2004). Temporary inactivation of the nucleus accumbens disrupts acquisition and expression of fear-potentiated startle in rats. *Brain Research*, *1027*(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.037>
87. Shan, Q., Haddrill, J. L., & Lynch, J. W. (2001). Ivermectin, an Unconventional Agonist of the Glycine Receptor Chloride Channel \*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(16), 12556–12564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011264200>
88. Simon, J., Wakimoto, H., Fujita, N., Lalande, M., & Barnard, E. A. (2004). Analysis of the Set of GABAA Receptor Genes in the Human Genome. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(40), 41422–41435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401354200>
89. Sugasawa, Y., Cheng, W. W., Bracamontes, J. R., Chen, Z.-W., Wang, L., Germann, A. L., Pierce, S. R., Senneff, T. C., Krishnan, K., Reichert, D. E., Covey, D. F., Akk, G., & Evers, A. S. (n.d.). Site-specific effects of neurosteroids on GABAA receptor activation and desensitization. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.55331>
90. Tateiwa, H., Chintala, S. M., Chen, Z., Wang, L., Amtashar, F., Bracamontes, J., Germann, A. L., Pierce, S. R., Covey, D. F., Akk, G., & Evers, A. S. (2023). The Mechanism of Enantioselective Neurosteroid Actions on GABAA Receptors. *Biomolecules*, *13*(2), 341. <https://doi.org/10.3390/biom13020341>
91. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
92. Tuckey, R. C., & Cameron, K. J. (1993). Catalytic properties of cytochrome P-450scc purified from the human placenta: Comparison to bovine cytochrome

P-450scc. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1163(2), 185–194.  
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90180-y](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90180-y)

93. Vuilleumier, P. H., Fritsche, R., Schliessbach, J., Schmitt, B., Arendt-Nielsen, L., Zeilhofer, H. U., & Curatolo, M. (2018). Mutations affecting glycinergic neurotransmission in hyperekplexia increase pain sensitivity. *Brain: A Journal of Neurology*, 141(1), 63–71. <https://doi.org/10.1093/brain/awx289>
94. Weir, C. J., Ling, A. T. Y., Belelli, D., Wildsmith, J. a. W., Peters, J. A., & Lambert, J. J. (2004a). The interaction of anaesthetic steroids with recombinant glycine and GABAA receptors†. *British Journal of Anaesthesia*, 92(5), 704–711. <https://doi.org/10.1093/bja/aeh125>
95. Weir, C. J., Ling, A. T. Y., Belelli, D., Wildsmith, J. a. W., Peters, J. A., & Lambert, J. J. (2004b). The interaction of anaesthetic steroids with recombinant glycine and GABAA receptors†. *British Journal of Anaesthesia*, 92(5), 704–711. <https://doi.org/10.1093/bja/aeh125>
96. White, N. M. (1996). Addictive drugs as reinforcers: Multiple partial actions on memory systems. *Addiction (Abingdon, England)*, 91(7), 921–949; discussion 951-965.
97. Wilkins, M. E., Caley, A., Gielen, M. C., Harvey, R. J., & Smart, T. G. (2016). Murine startle mutant Nmf11 affects the structural stability of the glycine receptor and increases deactivation. *The Journal of Physiology*, 594(13), 3589–3607. <https://doi.org/10.1113/JP272122>
98. Wu, F. S., Gibbs, T. T., & Farb, D. H. (1990). Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Molecular Pharmacology*, 37(5), 597–602.
99. Xiong, W., Cheng, K., Cui, T., Godlewski, G., Rice, K. C., Xu, Y., & Zhang, L. (2011a). Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to

- cannabis-induced analgesia. *Nature Chemical Biology*, 7(5), Article 5.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.552>
100. Xiong, W., Cheng, K., Cui, T., Godlewski, G., Rice, K., Xu, Y., & Zhang, L. (2011b). Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nature Chemical Biology*, 7(5), 296–303.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.552>
101. Xiong, W., Wu, X., Lovinger, D. M., & Zhang, L. (2012). A Common Molecular Basis for Exogenous and Endogenous Cannabinoid Potentiation of Glycine Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 32(15), 5200–5208.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6347-11.2012>
102. Yang, Z., Taran, E., Webb, T. I., & Lynch, J. W. (2012). Stoichiometry and Subunit Arrangement of  $\alpha 1\beta$  Glycine Receptors As Determined by Atomic Force Microscopy. *Biochemistry*, 51(26), 5229–5231.  
<https://doi.org/10.1021/bi300063m>
103. Yawno, T., Miller, S. L., Bennet, L., Wong, F., Hirst, J. J., Fahey, M., & Walker, D. W. (2017). Ganaxolone: A New Treatment for Neonatal Seizures. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2017.00246>
104. Yu, J., Zhu, H., Lape, R., Greiner, T., Du, J., Lü, W., Sivilotti, L., & Gouaux, E. (2021). Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor. *Cell*, 184(4), 957-968.e21.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.026>
105. Zarbin, M., Wamsley, J., & Kuhar, M. (1981). Glycine receptor: Light microscopic autoradiographic localization with [3H]strychnine. *The Journal of Neuroscience*, 1(5), 532–547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.01-05-00532.1981>



106. Zeilhofer, H. U., Acuña, M. A., Gingras, J., & Yévenes, G. E. (2018). Glycine receptors and glycine transporters: Targets for novel analgesics? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(3), 447–465. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2622-x>
107. Zeilhofer, H. U., Benke, D., & Yevenes, G. E. (2012). Chronic pain states: Pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 111–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134636>
108. Zhu, H. (2022). Structure and Mechanism of Glycine Receptor Elucidated by Cryo-Electron Microscopy. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 925116. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.925116>
109. Ziegler, E., Bodusch, M., Song, Y., Jahn, K., Wolfes, H., Steinlechner, S., Dengler, R., Bufler, J., & Krampfl, K. (2009). Interaction of androsterone and progesterone with inhibitory ligand-gated ion channels: A patch clamp study. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 380(4), 277–291. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00210-009-0440-x>