



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

**BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS BIOISOSTÉRICAS ANÁLOGAS  
A M554 Y M890 CON EFECTO FARMACOLÓGICO EN LA  
RESPUESTA DEL RECEPTOR DE GLICINA A ALTAS  
CONCENTRACIONES DE ETANOL.**



Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

YENIFER NICOLE ARGEL ALMONACID  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2021

Profesor Guía: José Leonardo Guzmán González  
Departamento de Fisiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

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

Profesor Guía

---

Dr. José Leonardo Guzmán González  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Patricio Alejandro Castro Maldonado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción



---

Dr. Ariel Ávila  
Facultad de Medicina  
Universidad Católica de la Santísima  
Concepción

Director de Programa

---

Dra. Elena Amparo Uribe Pérez  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer principalmente a mis padres y hermanos quienes en forma incondicional me han apoyado en cada una de las etapas durante mi formación personal, académica, científica y profesional. Así también, a otros integrantes de mi familia, a mi pareja, amigos y a quienes han contribuido directa o indirectamente durante este periodo.

A mi tutor el Dr. José Leonardo Guzmán y a la Dra. Verónica Jiménez por su apoyo, paciencia y gentil consideración durante el tiempo de desarrollo de este trabajo. Asimismo, no puedo dejar de agradecer a mis compañeros de laboratorio por su colaboración, conocimientos y técnicas científicas, especialmente a Laurie Aguayo y a Carolina Benítez.

Cabe destacar el apoyo de la facultad de Ciencias Biológicas a través de la beca de articulación, al departamento de Fisiología y a la Universidad de Concepción por la formación científica, la facilitación de espacios físicos y apoyo académico.

Finalmente, al financiamiento entregado por el *Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico* FONDECYT. Al *Research Triangle Institute* RTI por la facilitación y síntesis de los compuestos analizados.



## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
Hipótesis.....	16
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos .....	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
Estudios <i>in silico</i> .....	20
Diseño de moléculas .....	20
Preparación de la proteína Gβγ.....	20
Docking molecular.....	20
Ensamblaje de los complejos Gβγ-moléculas.....	21
Dinámica molecular.....	22
Cálculos de energía libre por MM-GBSA .....	23
Interacción Gβγ-moléculas .....	23
Estudios <i>in vitro</i> .....	24
Cultivos y líneas celulares .....	24
Transientes de Ca <sup>2+</sup> .....	24
Viabilidad celular .....	25
Estudios <i>in vivo</i> .....	25
Animales .....	25
Ensayos de rotarod acelerado .....	26
Moléculas análogas a M554 y M890.....	27
Análisis de datos .....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	28
Medición de transitorias de Ca <sup>2+</sup> en neuronas espinales.....	28
Recuperación de la coordinación motora mediante rotarod acelerado .....	31
Búsqueda de nuevos ligandos para interferir sobre el dímero Gβγ.....	34
Diseño de moléculas análogas a M554 .....	35

Docking molecular de análogos de M554.....	37
Diseño de moléculas análogas a M890 .....	39
Docking molecular de análogos de M890.....	42
Selección de moléculas análogas a M554 y M890 por dinámica molecular y MM-GBSA basándose en (R,R)-M554 .....	45
Caracterización del sitio de asociación de las nuevas moléculas análogas a M554 y M890.....	49
Viabilidad celular con moléculas análogas a M554 y M890 .....	57
<b>DISCUSIÓN</b> .....	59
Búsqueda de inhibidores del dímero Gβγ proteína clave en la activación del GlyR en la intoxicación aguda por etanol. ....	59
Moléculas pequeñas interfieren en los incrementos transitorios de Ca <sup>2+</sup> en neuronas espinales de 8-10 días de cultivo .....	60
Las moléculas M809_4 y M809_5 favorecen la recuperación de la coordinación motora en ratones intoxicados con etanol de forma aguda. ...	61
Modificaciones bioisostéricas .....	63
Conformación estructural de las nuevas moléculas por Docking molecular .....	64
Estudios de dinámica molecular para la selección de nuevas moléculas.....	65
Toxicidad celular de nuevas moléculas análogas a M554 y M890.....	68
Diseño de fármacos y problemas de solubilidad.....	69
<b>CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Receptor de glicina homomérico y heteromérico.....	6
<b>Figura 2</b>	Neurotransmisión glicinérgica.....	8
<b>Figura 3</b>	<i>Hotspot</i> en la proteína G $\beta\gamma$ .....	12
<b>Figura 4</b>	Sustituciones bioisostéricas clásicas.....	15
<b>Figura 5</b>	Representación de la estructura del dímero G $\beta\gamma$ usado en el docking molecular. ....	21
<b>Figura 6</b>	Protocolo rotarod acelerado.....	26
<b>Figura 7</b>	Análisis de transitorias de Ca <sup>2+</sup> intracelular obtenidos en neuronas espinales de ratón en el tratamiento agudo con etanol .....	29
<b>Figura 8</b>	Cuantificación de transitorias de Ca <sup>2+</sup> intracelular en neuronas espinales debido a la intoxicación aguda por etanol.....	30
<b>Figura 9</b>	Recuperación de los efectos de la intoxicación aguda por etanol en ensayos de rotarod acelerado con ratones C57BL/6J de 9-14 semanas.....	32
<b>Figura 10</b>	Representación de la estructura del dímero G $\beta\gamma$ .....	34
<b>Figura 11</b>	Molécula (R,R)-M554.....	35
<b>Figura 12</b>	Molécula M554.....	35
<b>Figura 13</b>	Moléculas análogas M554.....	36
<b>Figura 14</b>	Complejos G $\beta\gamma$ y análogos de M554.....	38
<b>Figura 15</b>	Molécula M809a.....	39
<b>Figura 16</b>	Molécula M890.....	39
<b>Figura 17</b>	Moléculas análogas M890.....	41
<b>Figura 18</b>	Complejos G $\beta\gamma$ y análogos de M890.....	43
<b>Figura 19</b>	Análisis de dinámica de interacción de la molécula (R,R)-M554 en la proteína G $\beta\gamma$ .....	48
<b>Figura 20</b>	Análisis de dinámica de interacción de la molécula (R)-2T_175 en la proteína G $\beta\gamma$ .....	50
<b>Figura 21</b>	Análisis de dinámica de interacción de la molécula (S)-2T_175 en la proteína G $\beta\gamma$ .....	52

<b>Figura 22</b>	Análisis de dinámica de interacción de la molécula (R,S)-4M554_2 en la proteína G $\beta$ γ .....	54
<b>Figura 23</b>	Análisis de dinámica de interacción de la molécula (R)-2T_181 en la proteína G $\beta$ γ.....	56
<b>Figura 24</b>	Análisis de viabilidad celular frente a la incubación con las moléculas que se indican. ....	58





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Sustituciones bioisostéricas en M554.....	36
<b>Tabla 2</b>	Evaluación de los bioisómeros de M554. ....	37
<b>Tabla 3</b>	Sustituciones bioisostéricas en M890.....	40
<b>Tabla 4</b>	Evaluación de los bioisómeros de M890. ....	42
<b>Tabla 5</b>	Energías de interacción por el método MM-GBSA y RMSD a 20 ns y 70 ns de los análogos de M554 y de M890.....	46



## ANEXOS

<b>Anexo 1</b>	Control de la Proteína G $\beta\gamma$ .....	87
<b>Anexo 2</b>	Evaluación funcional de la sonda a través de lisados celulares de HEK-293 con MQAE 1 mM y 2 mM.....	88
<b>Anexo 3</b>	Fluorescencia en células HEK-293 tratadas con la sonda MQAE 1 mM por 12hrs y Gráfico de Stern-Volmer .....	89
<b>Anexo 4</b>	Co-transfección con los plásmidos de mCherry y la subunidad $\alpha 1$ -GlyR en la línea celular HEK-293 con posterior incubación de MQAE. ....	90



## ABREVIATURAS

<b>Amber</b>	:	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement.</i> Construcción asistida de modelos con refinamiento energético.
<b>Bioisósteros</b>	:	Sustituyentes químicos o grupos con propiedades físicas y químicas similares que producen efectos biológicos semejante a otro compuesto químico.
<b>DMSO</b>	:	<i>Dimetilsulfóxido.</i> Molécula altamente polar que facilita la solubilidad de moléculas pequeñas.
<b>Frames</b>	:	Conjunto de coordenadas de la interacción proteína-ligando almacenados cada cierto fragmento del tiempo de simulación, lo que permite realizar análisis estadísticos.
<b>GlyR</b>	:	Receptor de glicina.
<b>G<math>\beta\gamma</math></b>	:	Dímero $\beta\gamma$ de la proteína G.
<b>HEK-293</b>	:	Línea celular embrionaria de riñón humano 293.
<b>HP-<math>\beta</math>-CD</b>	:	<i>Hidroxipropil <math>\beta</math>-ciclodextrina.</i> Compuesto utilizado para mejorar la solubilidad de las moléculas.
<b>LGICs</b>	:	Superfamilia de canales iónicos activados por ligando.
<b>MM-GBSA</b>	:	<i>Molecular Mechanics Generalized- Born Surface Area.</i> Es un método rápido basado en campos de fuerza que calcula la energía libre de enlace aproximada.
<b>PDB</b>	:	<i>Protein Data Bank.</i> Base de datos de estructuras cristalográficas resueltas.
<b>RMSD</b>	:	<i>Root Mean Square Deviation.</i> Desviación de la posición original de uno o más pares de átomos.
<b>VMD</b>	:	<i>Visual Molecular Dynamics.</i> programa de modelamiento molecular y visualización de estructuras. Además, es una herramienta para analizar resultados de las simulaciones de dinámica molecular.

## RESUMEN

El etanol es una droga que presenta altos índices de consumo. Actúa principalmente como un inhibidor neuronal, con un efecto inicial estimulante caracterizado por desinhibición emocional. A medida que aumenta la dosis se observan síntomas graves como la depresión respiratoria, coma y finalmente la muerte en muchos casos. Esta molécula interfiere con distintos blancos celulares, entre ellos el receptor de glicina (GlyR), canal iónico que es potenciado por el etanol. En el último tiempo se ha identificado a la proteína  $G\beta\gamma$  como responsable de esta activación al interactuar en el dominio citoplasmático característico del receptor. La determinación de la estructura de la proteína  $G\beta\gamma$  y su rol sobre el receptor de glicina ha permitido realizar avances en la búsqueda de un fármaco capaz de inhibir los efectos provocados por el etanol. Diversos estudios han buscado un inhibidor de  $G\beta\gamma$  enfocándose en el uso de péptidos, para luego continuar con moléculas pequeñas como M554 y M890 que actúan sobre  $G\beta\gamma$  inhibiendo parcialmente los efectos del etanol. Basándose en las estructuras de estas moléculas se logró identificar las moléculas (R,S)-M554\_3, (S)-M554\_13, (R)-M554\_13, M809\_4 y M809\_5 las cuales logran establecer interacciones en el *hotspot* de  $G\beta\gamma$  de acuerdo a análisis bioinformáticos, y en ensayos de viabilidad celular demostraron no inducir muerte celular.

A partir del tema expuesto se propone realizar la siguiente investigación que tiene como **objetivo general: Identificar nuevas moléculas pequeñas capaces de actuar como inhibidores de los efectos del etanol sobre la activación del receptor de glicina.**

La primera etapa de este trabajo consistió en estudiar la acción del etanol sobre la conectividad sináptica y la interferencia de las moléculas M809\_4 y M809\_5 sobre este efecto. Obteniendo como resultado disminución en la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  por etanol intracelular. De igual forma, se obtiene disminución en la frecuencia por parte de M809\_5, efecto que es potenciado en presencia de etanol. Además, mediante ensayos de rotarod acelerado se comprobó que las moléculas M809\_4 y M809\_5 inducen recuperación de la coordinación motora en ratones intoxicados por etanol. Para la segunda etapa se presentan las moléculas (R,S)-4M554\_2, (R)-2T\_181, (S)-2T\_175 y (R)-2T\_175 ligandos que no afectan la sobrevivencia celular y que se proponen para continuar con la búsqueda de inhibidores de  $G\beta\gamma$ .

## ABSTRACT

Ethanol is a drug with high consumption rates. It acts mainly as a neuronal inhibitor, with an initial stimulating effect characterized by emotional disinhibition. As the dose increases, serious symptoms are observed such as respiratory depression, coma and finally death in many cases. This molecule interferes with various cellular targets, including the glycine receptor (GlyR), an ion channel that is enhanced by ethanol. Recently, the protein G $\beta\gamma$  has been identified as responsible for this activation by interacting in the cytoplasmic domain characteristic of the receptor. The determination of the structure of the protein G $\beta\gamma$  and its role on the glycine receptor has allowed progress in the search for a drug capable of inhibiting the effects caused by ethanol. Several studies have sought an inhibitor of G $\beta\gamma$  focusing on the use of peptides, and then continue with small molecules such as M554 and M890 that act on G $\beta\gamma$  partially inhibiting the effects of ethanol. Based on the structures of these molecules it was possible to identify the molecules (R,S)-M554\_3, (S)-M554\_13, (R)-M554\_13, M809\_4 and M809\_5 which manage to establish interactions in the hotspot of G $\beta\gamma$  according to bioinformatic analysis, and in cell viability tests they demonstrated not to induce cell death.

From the exposed subject, it is proposed to carry out the following research with the general objective: **To identify new small molecules capable of acting as inhibitors of ethanol effects on glycine receptor activation.**

The first stage of this work consisted in studying the action of ethanol on synaptic connectivity and the interference of molecules M809\_4 and M809\_5 on this effect. As a result, the frequency of Ca<sup>2+</sup> transitions by intracellular ethanol was reduced. Similarly, a decrease in frequency is obtained by M809\_5, an effect that is enhanced in the presence of ethanol. In addition, it was proved that M809\_4 and M809\_5 molecules induce recovery of motor coordination in ethanol intoxicated mice. For the second stage, (R,S)-4M554\_2, (R)-2T\_181, (S)-2T\_175 and (R)-2T\_175 ligands that do not affect cell survival are presented and proposed to continue the search for inhibitors from G $\beta\gamma$ .

## INTRODUCCIÓN

El etanol ha sido de las drogas con mayor aceptación social y su consumo se encuentra muy arraigado en nuestra cultura. Su uso ha estado ligado a una serie de enfermedades y trastornos, sin dejar de mencionar los problemas sociales que conlleva. El alcohol es una droga depresora del *Sistema Nervioso Central* (SNC) que inhibe progresivamente las funciones cerebrales afectando la capacidad de autocontrol. En el año 2018 el consumo de alcohol fue responsable de alrededor de 3 millones de muertes en todo el mundo, un tercio de las cuales ocurren en Europa (World Health Organization, 2014, 2018).

La ingesta de alcohol en Chile fue situada en el tercer lugar de los países latinoamericanos en el consumo *per cápita* de alcohol por año, con un total de 9,3 litros de alcohol puro en adultos siendo la droga más consumida y en cantidades considerablemente mayores en comparación con países de la región (World Health Organization, 2018).

La lista de las enfermedades que produce es larga, entre las que podemos mencionar, los trastornos depresivos unipolares (10.5%), la cirrosis hepática (7.7%), los accidentes de tránsito (7.6%) y las agresiones (6.3%) (SENDA-MINSAL, 2016). Además, en el 2016 fue la droga de abuso que mayoritariamente motivo el ingreso a tratamiento en un 35,3% de los casos (SENDA-MINSAL, 2016, 2018).

En relación al consumo agudo, el etanol proporciona numerosos efectos sobre la conciencia humana y las interacciones sociales, estas características tienen directa relación con la concentración sanguínea, ya que en bajas dosis se manifiestan síntomas como la desinhibición, euforia, incoordinación motora, en cambio a altas concentraciones se genera la *intoxicación etílica aguda* (IEA) produciendo síntomas graves como, la depresión cardiorrespiratoria, coma y finalmente la muerte del paciente (Mora, 2016; Vena *et al.*, 2020). Más allá de las consecuencias para la salud, el uso nocivo del alcohol trae importantes pérdidas sociales y económicas a los individuos y a la sociedad en general.

### **Los Canales Iónicos Activados por Ligando**

En el último tiempo se ha demostrado la relevancia del consumo del etanol, relacionado con su efecto sobre varios blancos celulares. Los primeros estudios relacionaron al etanol con la inhibición de la liberación neurotransmisora de la acetilcolina en la corteza (Phillis & Jhamandas, 1971). Estudios posteriores se ampliaron para demostrar el rol del

etanol en el mecanismo de inhibición de los canales iónicos dependientes del voltaje (Harris & Hood, 1980). En este sentido los *Canales iónicos activados por ligando* (LGIC) han recibido considerable atención como sitios de acción del etanol (Deitrich *et al.*, 1989; Aguayo *et al.*, 1990 Molander *et al.*, 2007). Los LGIC son proteínas transmembrana que juegan un papel importante en la transmisión sináptica y en la modulación de la actividad celular. En los mamíferos esta superfamilia LGICs se divide en tres familias principales de acuerdo al número de segmentos transmembrana presentes en cada una de las subunidades que forman los canales iónicos (Hogg *et al.*, 2005). La primera familia de LGIC son los receptores P2X (*trifosfato de adenosina*, ATP); estos son canales catiónicos y se ha descrito que contienen tres subunidades. Cada subunidad contiene dos segmentos transmembrana separados por un gran bucle extracelular (Illes & Ribeiro, 2004). La segunda familia son los receptores catiónicos activados por glutamato, que incluyen los receptores de ácido *N-metil-D-aspartato* (NMDA), *α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico* (AMPA) y *kainato* (KA) (Bennett & Dingledine, 1995). Estos se componen de cuatro subunidades homólogas. Los receptores de glutamato tienen solo tres dominios transmembrana (TM1, TM3 y TM4) más un bucle de membrana reentrante en la cara citoplasmática (TM2) (Bennett & Dingledine, 1995). La tercera familia corresponde a los receptores *cys-loop* llamados así por un dominio extracelular que forma un bucle entre dos residuos de cisteína presentes en la región N-terminal dando lugar a un puente disulfuro. Entre algunos miembros de los *cys-loop* encontramos los *receptores de glicina* (GlyRs), *receptores nicotínicos de acetilcolina* (nAChR), *receptores de serotonina* (5-HT<sub>3</sub> R), *ácido gamma aminobutírico* (GABA) tipo A y C (Hogg *et al.*, 2005; Lynch, 2004), además, se han identificado receptores ZAC activados por Zn<sup>+2</sup> (Davies *et al.*, 2003). Los últimos descubrimientos acerca del mecanismo de acción y la relación de los efectos del etanol, podríamos destacar la capacidad de actuar como un depresor del *sistema nervioso central* (SNC) (Mukherjee, 2013). Estos efectos podrían estar mediados por la acción del etanol en LGIC, disminuyendo la transmisión excitadora y aumentando la transmisión inhibitoria (Dopico & Lovinger, 2009).

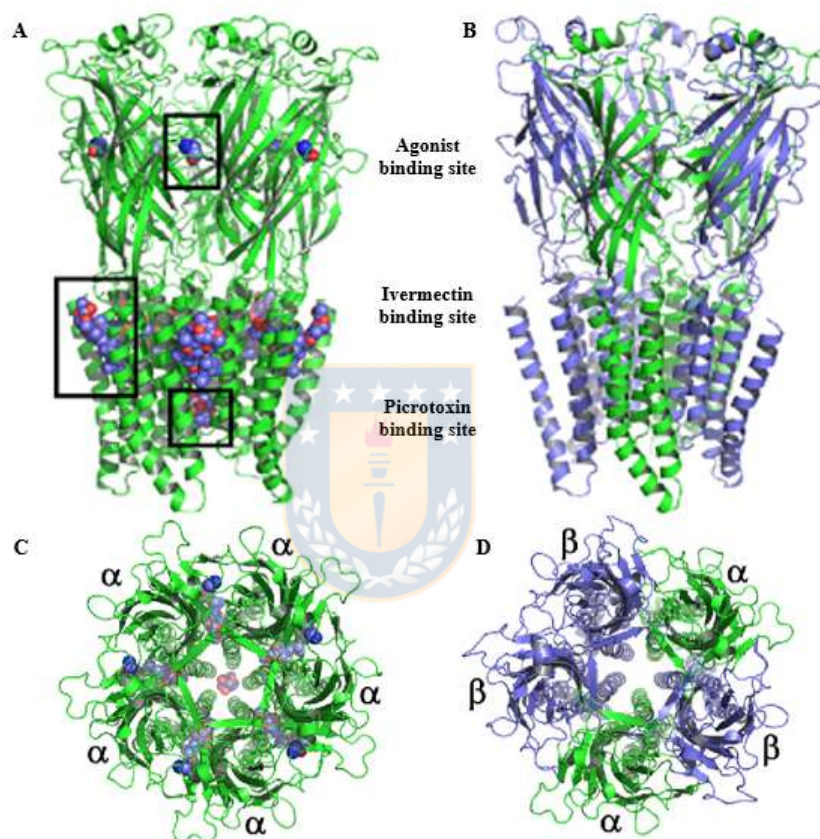
## Receptores de Glicina

Los GlyR se expresan en las interneuronas y las neuronas motoras de la médula espinal (Aprison & Werman, 1965; Lynch, 2009), específicamente en el asta ventral y dorsal de la médula espinal; Núcleos motor, auditivo, vestibular y sensorial del tronco cerebral; colículo superior; capa de células granulares del cerebelo; retina; bulbo olfatorio; y en el hipocampo (Pittock & Vincent, 2016). En algunos casos particulares, se expresa en el núcleo accumbens (nAc) región involucrada en el sistema de recompensa del cerebro, un efecto que puede ser importante para la adicción al alcohol (Molander *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2020). El canal de cloruro que forma el GlyR media la transmisión sináptica y se encuentran involucrados en diversas funciones fisiológicas importantes, tales como la coordinación motora, la regulación del ritmo respiratorio, la transmisión del dolor y el desarrollo neuronal (Legendre, 2001; Lynch, 2004; Burgos *et al.*, 2016). Su activación en el aducto aumenta la conductividad de iones de cloruro en las neuronas resultando en la hiperpolarización de la membrana y la reducción de la excitabilidad (Perkins *et al.*, 2010) celular. Estructuralmente los GlyRs son proteínas pentaméricas que mantienen una disposición alrededor de un poro formando el canal de iones compuestos por combinaciones de subunidades  $\alpha$  (homoméricos), como se observa en la figura n°1; o por la combinación de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ) y  $\beta$  (heteropentaméricos), se suelen encontrar formando complejos moleculares con una estequiometría de  $2\alpha$ - $3\beta$  o  $3\alpha$ - $2\beta$  (Lynch, 2009). El complejo nativo es de aproximadamente 250 kDa y está compuesto por dos subunidades principales:  $\alpha$  (48 kDa) y  $\beta$  (58 kDa) (Langosch *et al.*, 1990).

Cada subunidad  $\alpha$  posee cuatro dominios transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4) y un gran *loop intracelular* (IL) entre TM3 y TM4 responsable de la modulación de la transducción de señales intracelulares. Además, cada una de las cinco subunidades aporta un dominio anfipático llamado TM2 responsable de la formación del poro (Lynch, 2004, 2009). En tanto, la subunidad  $\beta$  se encuentra asociada a la proteína gefirina, cuya función es anclar el receptor al citoesqueleto (Joachim Kirsch *et al.*, 1995).



La expresión de las subunidades  $\alpha$  es controlada regional y temporalmente durante el desarrollo y maduración del SNC. El gen más abundante codifica para la subunidad  $\alpha 1$  y en menor medida para el gen de la subunidad  $\alpha 3$  y son principalmente activos en la médula espinal y en el tronco cerebral en estadios postnatales (Laube *et al.*, 2002). En adultos la mayoría de la neurotransmisión glicinérgica es mediada por GlyR heteroméricos  $\alpha 1\beta$  (Legendre, 2001; Lynch, 2009). Por otro lado, el gen que codifica la subunidad  $\beta$  se expresa ampliamente en todo el SNC embrionario y adulto.



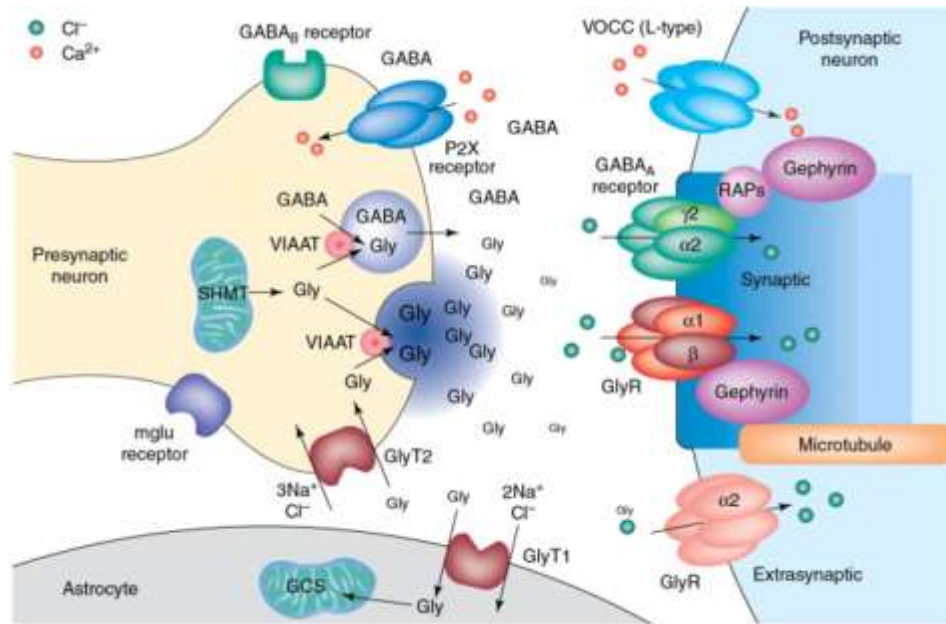
**Figura 1: Receptor de glicina homomérico y heteromérico.** A) Observamos las cinco subunidades  $\alpha$ -GlyR homomérico destacando los sitios de union de algunos moduladores; B) El GlyR heteropentaméricos compuesto por las subunidades  $2\alpha 3\beta$ -GlyR; C) y en D) La vista superior de los GlyR homoméricos con los moduladores y heteropentamérico, respectivamente (Dutertre *et al.*, 2012).

## **Sinapsis inhibitoria glicinérgica**

La glicina y GABA son los mediadores en la neurotransmisión inhibitoria rápida en el sistema nervioso maduro mediante la activación de los receptores postsinápticos de glicina y GABA A, reduciendo la excitabilidad neuronal a través de la hiperpolarización postsináptica. Las neurotransmisiones inhibitorias en el tronco encefálico adulto y la médula espinal están predominantemente mediados por la glicina y desempeñan funciones esenciales en el control de la generación del ritmo motor, la coordinación de las respuestas de los reflejos y el procesamiento de las señales sensoriales.

En las terminales de las neuronas que contienen glicina, la enzima *serina hidroximetiltransferasa* (SHMT) sintetiza la glicina en las mitocondrias, la libera en el citosol y la concentra en pequeñas vesículas sinápticas mediante el *transportador de aminoácidos inhibitorio vesicular* (VIAAT), que también media la absorción de GABA (Laube *et al.*, 2002; Sagné *et al.*, 1997). La excitación del terminal provoca la liberación de glicina activada por  $\text{Ca}^{2+}$  en la hendidura sináptica, abriendo los GlyR postsinápticos; por lo tanto, aumenta la conductancia de  $\text{Cl}^-$  en respuesta a la unión del agonista, como se observa en la figura 2. La transmisión se termina por la recaptación de glicina mediada por transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  ubicados en las membranas plasmáticas presinápticas (GlyT2) y gliales (GlyT1) (Zafra *et al.*, 1997). Entre las estrategias para regular los niveles de glicina en la hendidura sináptica se encuentran los receptores presinápticos de glutamato metabotrópico (mglu) que inhiben la liberación de glicina al reducir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Katsurabayashi *et al.*, 2001).

En el desarrollo neuronal, la activación de los GlyRs provoca el influjo de  $\text{Cl}^-$  lo que lleva a una hiperpolarización rápida conocido como *potenciales postsinápticos inhibitorios* (IPSPs) (). Además, cabe destacar los canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (Ej. los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje (VOCC) y los receptores P2X, la agrupación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kirsch & Betz, 1998) y la potenciación inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  de GlyRs son cruciales para la maduración plasticidad de las sinapsis glicinérgicas (Fucile *et al.*, 2000; Laube *et al.*, 2002).



**Figura 2: Neurotransmisión glicinérgica.** Se indican los siguientes elementos presinápticos: el transportador de glicina, GLYT2; receptor GABA B; receptor P2X; receptores de glutamato metabotrópico, mglu; transportador de aminoácidos inhibitorios vesiculares, VIAAT; glicina y GABA; la enzima serina hidroximetiltransferasa, SHMT. En astrocitos el transportador de glicina, GLYT1; sistema de escisión de la glicina, GCS. En los elementos postsinápticos se indican los receptores de glicina GlyR ( $\alpha1\beta$ -GlyR y  $\alpha2$ -GlyR) y GABA A; las proteínas asociadas gefirina; proteínas asociadas a receptores, RAP; los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje, VOCC (Laube *et al.*, 2002).

### Rol del $Ca^{2+}$ en la sinapsis neuronal

Desde el punto de vista general y funcional es importante mencionar el rol que ejerce el  $Ca^{2+}$  como segundo mensajero universal que regula las actividades más importantes en las células eucariotas. Particularmente, en el caso de las neuronas ya que están implicados en el crecimiento, desarrollo y remodelación de las neuritas, regulación de la excitabilidad neuronal, modulando en la fuerza de las conexiones sinápticas y la activación de las vías de supervivencia y muerte celular programada, importantes para la plasticidad neuronal que subyacen a funciones críticas, como el aprendizaje y la memoria (Hagenston & Baing, 2011). La transmisión eléctrica está mediada por uniones entre las neuronas, grupos de canales intercelulares que permiten la comunicación directa de dos células adyacentes dando lugar al paso bidireccional de corrientes eléctricas y moléculas pequeñas ( $Ca^{2+}$ , cAMP,  $IP_3$ , entre

otros). Los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  que invaden el núcleo celular parecen jugar un papel particularmente importante en la transcripción dependiente de la actividad (Hardingham *et al.*, 1997) y son críticos para varias respuestas adaptativas duraderas, que incluyen neuroprotección adquirida y formación de memoria (Bading, 2000).

La regulación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es a través de *canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje* (VDCC) tipo L y de los canales activados por ligando, como los *receptores N-metil-D-aspartato* (NMDARs) (Bading *et al.*, 1993), los *receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionato* (AMPA) (Jonas & Burnashev, 1995), y mediante la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del *retículo endoplasmático* (RE) (Hardingham & Bading, 1998). Asimismo, uno de los mecanismos de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE es modulada por *fosfolipasa C* (PLC) a través de la vía de señalización que involucra a las proteínas G, donde la disociación del heterotrímero  $\text{G}\alpha\beta\gamma$ , induce la asociación del dímero  $\text{G}\beta\gamma$  a fosfolipasa C, activándola. Esta enzima posteriormente hidroliza  $\text{PIP}_2$ ; en DAG e  $\text{IP}_3$  que actúan como segundos mensajeros. La liberación de  $\text{IP}_3$  induce la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE provocando la movilización y salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma (Loreto San Martín, Tesis Doctorado Ciencias Biológicas, 2016)

La regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  es una etapa clave debido al rol que ejerce sobre varios tipos de canales iónicos (Fucile *et al.*, 2000; Irwin & Levitan, 1999). La potenciación inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser importante para la modulación rápida de las sinapsis glicinérgicas. La actividad del GlyR es modulada a través de fosforilaciones por proteínas quinasas A y C (Vaello *et al.*, 1994). De igual forma, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  ejercen una potente y rápida modulación de GlyRs, controlando la activación de canales a través de un intermediario citoplasmático sensible a la difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fucile *et al.*, 2000).

### **Agonistas y antagonistas del receptor de glicina**

En la actualidad, se conocen una serie de moduladores que potencian las corrientes del GlyR. El agonista endógeno que activa al receptor es la glicina, además, podemos mencionar a los  $\beta$ -aminoácidos endógenos (grupo amino unido al  $\text{c}\beta$ ) como,  $\beta$ -alanina y taurina con actividad inhibitoria cuando se aplican en neuronas (Laube *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2015). Curiosamente, algunas azúcares como la glucosa y fructosa a concentraciones fisiológicas (10 mM de azúcar) modulan positivamente el GlyR en humanos (Breitinger *et*

*al.*, 2015). Otra molécula con actividad agonista es Ivermectina, una lactona macrocíclica que produce efectos a concentraciones bajas (0,03  $\mu\text{M}$ ) potenciando la respuesta a concentraciones de glicina por debajo de la saturación y en concentraciones más altas ( $\geq 0,03$   $\mu\text{M}$ ) activa de manera irreversible tanto  $\alpha 1$  homomérico como  $\alpha 1\beta$  heteroméricos (Shan *et al.*, 2001). Cabe mencionar, que entre los anestésicos el propofol, potencia las corrientes mediadas por glicina en neuronas  $\alpha 1$ -GlyR (Laube *et al.*, 2002).

Finalmente, se ha demostrado que los receptores formados por  $\alpha 1$ -GlyR tienen un rol sobre los efectos sedantes del etanol y se ha confirmado el papel de los residuos de KK385-386 en estos efectos (Aguayo *et al.*, 2014; Burgos *et al.*, 2016). Estudios sobre GlyRs recombinantes y nativos han demostrado que los receptores formados por el  $\alpha 1$  son más sensibles al etanol que los que poseen la isoforma  $\alpha 2$  (Mascia *et al.*, 1996; Yévenes *et al.*, 2010). Por otro lado, los GlyR que contienen  $\alpha 3$  son relativamente insensibles al etanol y a la modulación de  $G\beta\gamma$ . Más recientemente, se destaca la importancia del residuo G254 (ubicado en  $\alpha 1$  en TM-2), un elemento clave para la sensibilidad al etanol y la modulación de  $G\beta\gamma$  en  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (Sánchez *et al.*, 2015; Yevenes *et al.*, 2010). Este residuo es necesario, pero no es suficiente para la sensibilidad al etanol y la modulación de  $G\beta\gamma$  en  $\alpha 3$ . Más bien, se destaca que el casete  $\alpha 3\text{L}$  y el extremo C extracelular como nuevos determinantes de la sensibilidad al etanol y la modulación de  $G\beta\gamma$  para  $\alpha 3$ -GlyR (Sánchez *et al.*, 2015). Estos elementos son claves para la baja sensibilidad al etanol y forman la base molecular de la modulación selectiva de subtipos de GlyR por el etanol.

Entre los antagonistas de los GlyRs la estriquina, alcaloide de origen vegetal capaz de bloquear las corrientes generadas por todas las subunidades del GlyR, mientras que la picrotoxina es un inhibidor de GABA A y de GlyR. Mientras que la picrotoxina es utilizado para discriminar entre receptores homo-oligoméricos  $\alpha 1$ -GlyRs de hetero-oligoméricos (Pribilla *et al.*, 1992). Un antagonista específico sobre subtipos del GlyR es *ciclotiazida* (CTZ) que inhibe  $\alpha 2$ -GlyRs en cultivos neuronales de hipocampo de rata. La inhibición fue dependiente de la concentración de glicina, lo que sugiere un mecanismo competitivo (Zhang *et al.*, 2008; Söderpalm *et al.*, 2017). Además, se han identificado bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L como verapamilo y varias dihidropiridinas bloqueadores de las respuestas de glicina en las neuronas de la medula espinal (Chesnoy-Marchais & Cathala, 2001; Laube *et al.*, 2002).



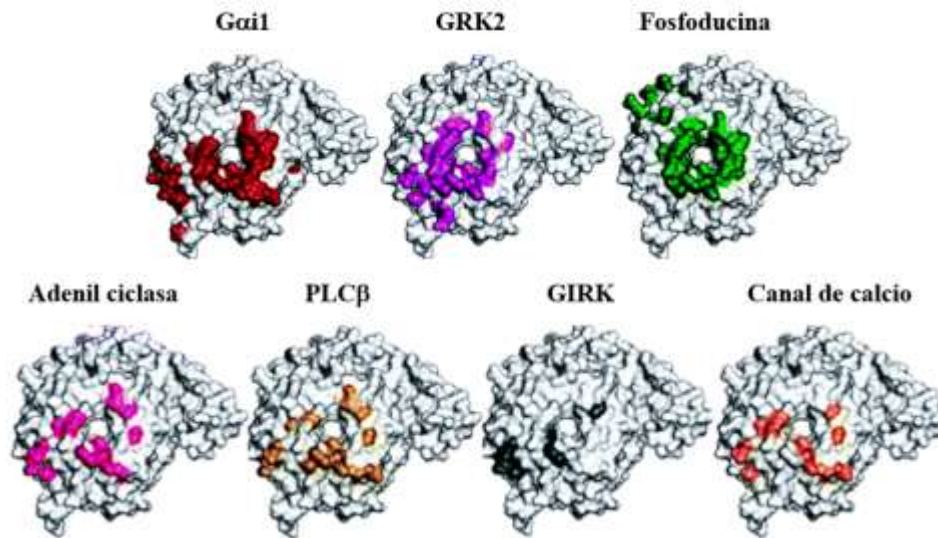
## Modulación de la proteína G $\beta\gamma$ sobre el receptor de glicina

En la última década se ha descrito el dímero G $\beta\gamma$  de las proteínas G como uno de los principales moduladores en la activación del GlyR en presencia de etanol (Yévenes *et al.*, 2003). En el mecanismo de activación involucra dos motivos básicos dentro del gran bucle intracelular de la subunidad  $\alpha$ 1-GlyR que van desde el 316-320 y 385-386 (Yévenes *et al.*, 2003, 2006, 2008) que demostraron ser esenciales para la potenciación mediada por el dímero G $\beta\gamma$ .

Las proteínas G catalizan el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  en un proceso que requiere las tres subunidades. La unión de GTP da como resultado la activación de la proteína G y la disociación de la subunidad  $\alpha$  de las subunidades G $\beta\gamma$ . Las subunidades G $\alpha$  y G $\beta\gamma$  interactúan con moléculas efectoras, como las fosfolipasas y los canales iónicos de una manera que conduce a su activación o inhibición (Clapham & Neer, 1997). Una variedad de estudios *in vitro* ha demostrado que cuando las subunidades G $\beta\gamma$  están unidas al  $\alpha$ -GDP son incapaces de modular efectores. Por lo tanto, se cree que la activación y desactivación de la transducción de señales mediada por subunidades G $\beta\gamma$  en células se basa en la disociación y la reasociación de las subunidades  $\alpha$  unidas a GTP y GDP, respectivamente (Scott *et al.*, 2001).

El dímero G $\beta\gamma$  está compuesto por la subunidad  $\beta$  que presenta una estructura  $\beta$  helicoidal de 7 aspas que contiene el motivo WD-40 y un dominio de hélice  $\alpha$  hacia el extremo amino. La subunidad  $\gamma$  presenta una estructura helicoidal extendida que le permite interactuar fuertemente con el extremo amino de la subunidad  $\beta$  (Fehlhammer *et al.*, 1977; Oldham & Hamm, 2008). Un dominio WD-40 canónico comprende 7 hojas, cada una de las cuales contiene 40–60 residuos con un motivo de WD (triptófano y ácido aspártico). Las funciones ligadas al dímero G $\beta\gamma$  tiene relación con varios efectores moleculares de alta relevancia fisiológica como en el *receptor quinasa 2 acoplados a proteínas G* (GRK2), regulando negativamente en adenil ciclasa (Tang *et al.*, 1991), mediando en la actividad de fosfolipasa C $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2) (Bonacci *et al.*, 2005), *canales de potasio rectificadores hacia el interior acoplados a la proteína G* (GIRK) (Logothetis *et al.*, 1987), el *fosfoinositol 3-quinasa  $\gamma$*  (PI3K $\gamma$ ) (Stephens *et al.*, 1994) y *canales de calcio tipo N* (Ikeda, 1996). Además, son capaces de iniciar la cascada donde se encuentran las *proteínas quinasa activadas por mitógenos* (MAPK) (Khan *et al.*, 2013) importante en la señalización celular.

Los efectores se unen a la proteína G $\beta\gamma$  en una región común denominado “hotspots” que es una región favorecida para establecer relaciones proteína-proteína (Davis *et al.*, 2005), como se observa en la figura 3.



**Figura 3: Hotspot en la proteína G $\beta\gamma$ .** Región sobre G $\beta\gamma$  donde interactúan gran parte de los efectores moleculares de relevancia fisiológica (Davis *et al.*, 2005)

### **Péptidos para interferir sobre la proteína G $\beta\gamma$**

La activación de los efectores mediada por la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G tiene diversos roles en la regulación de la fisiología celular. Podríamos destacar los estudios realizados en el análisis de las interacciones efectoras del dímero G $\beta\gamma$  para ello se han utilizado péptidos sintéticos, utilizando los aminoácidos 956–984 de la proteína *adenil ciclasa* tipo 2 (AC2) (péptido QEHA) (Chen *et al.*, 1995). Este péptido bloquea la activación de varios efectores incluyendo AC2, PLC $\beta$ 3, GIRK y la *quinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico* ( $\beta$ ARK) con IC<sub>50</sub> de 50–100  $\mu$ M (Weng *et al.*, 1996). Estos datos sugieren que el péptido se une a un sitio compartido por varios efectores.

Posteriormente, a partir de una biblioteca de péptidos aleatorios expresados en fagos se identifica el péptido SIRK (SIRKALNILGYPDYD) capaz de bloquear la regulación de PLC  $\beta$ 2 y PI3K *in vitro* (Scott *et al.*, 2001). Para conocer la zona donde se une este péptido en G $\beta\gamma$  se utilizó un análogo SIGK y por medio de estudios cristalográficos se determinó que el péptido se une al *hotspot* en la proteína (Davis *et al.*, 2005) permitiéndonos conocer características de esta región.

A continuación, utilizando una estrategia similar en nuestro laboratorio se diseñó un péptido a partir del dominio citoplasmático del GlyR (Yévenes *et al.*, 2003, 2006). El péptido RQH (RQHKELLRFRRKRRHHK) que posee 17 aminoácidos y ha demostrado que los efectos del etanol sobre el receptor pueden ser inhibidos *in vitro* (Gúzman *et al.*, 2009), sin embargo, su efecto inhibitorio no fue específico hacia el GlyR. Para mejorar la especificidad se diseñó un péptido pequeño de 7 aminoácidos RQHc7 (RFRRKRR) derivado de la región aminoterminal del dominio citoplasmático del GlyR el cual es capaz de interferir con la interacción G $\beta$  $\gamma$ -GlyR e inhibir la potenciación por etanol del GlyR (Gúzman *et al.*, 2009). Mediante estudios de docking y *Dinámica Molecular* (DM) se determinó que el péptido RQHc7 interactúa con los residuos de ácido aspártico 186, 228 y 246 en G $\beta$  y parecen ser críticos para la interacción con RQHc7, posiblemente contribuyendo electrostáticamente con cargas negativas para interactuar con los residuos de arginina 3, 6 y 7 en el heptapéptido (Fabián Cerda, Tesis Bioingeniería, 2012).

Las moléculas peptídicas han demostrado no ser los candidatos farmacológicos más favorables para ser ensayado en modelos animales, debido a que su tamaño y estructura dificultaría su paso hacia el SNC (Finkelstein *et al.*, 1991). Sin embargo, estos péptidos son las primeras aproximaciones en la búsqueda de un fármaco específico que inhiba los efectos generados por el consumo en altas dosis de etanol.

### **Moléculas pequeñas para interferir sobre la proteína G $\beta$ $\gamma$**

Para identificar moléculas con potencial farmacológico capaces de unirse a G $\beta$  $\gamma$  se realizó un Screening Virtual de una base de datos de moléculas pequeñas ZINC sobre la región de unión en G $\beta$  $\gamma$  de RQHc7. Para el filtrado de estas moléculas se utilizó como estrategia la predicción de descriptores, docking sucesivos y predicción de energía libre de unión, se obtuvieron 61 moléculas pequeñas con una alta capacidad de unión al sitio en G $\beta$  $\gamma$  (Fabián Cerda, Tesis Bioingeniería, 2012; San Martín *et al.*, 2012). Las moléculas se sometieron a estudios de electrofisiología y se identificaron las moléculas M554 (un derivado indol) y M890 (un derivado urea), las cuales inhibieron la potenciación del GlyR por etanol en células HEK-293 a 200  $\mu$ M e inhibieron la potenciación por etanol de la constante de tiempo de decaimiento en eventos glicinérgicos sinápticos en neuronas espinales en cultivo. Cuando se realizaron ensayos de comportamiento animal usando estos dos compuestos, se encontró que M554 fue capaz de revertir parcialmente los efectos de altas dosis de etanol en

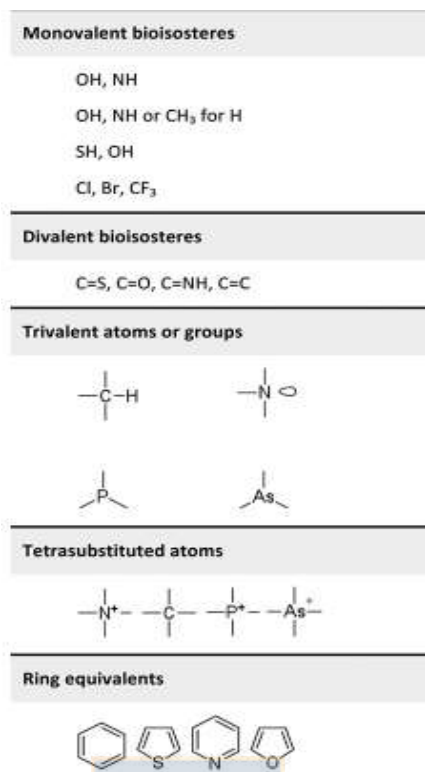


ensayos de rotarod acelerado y *ensayos de pérdida del reflejo de enderezamiento* (LORR) en ratones C57BL/6J ambos son experimentos en los que se evalúa coordinación motora, función fisiológica regulada por GlyR. Adicionalmente se demostró que M554 es capaz de elevar los niveles de dopamina en núcleo accumbens (nAc) de ratas Wistar a través de un mecanismo que involucra a los GlyRs (San Martín *et al.*, 2016)

Los estudios realizados en M554 y M890 se llevaron a cabo con las mezclas de estereoisómeros de M554 y M890. Luego se procedió con ensayos de electrofisiología usando estereoisómeros puros de M554 y enantiómeros de M890, obteniendo para M554 que las formas (R,R)-M554 y (S,R)-M554 son activas al evaluar su rol inhibitor sobre la potenciación del GlyR mediado por etanol, mientras que para la molécula M890 el enantiómero (R)-M890 presentó actividad (Loreto San Martín, Tesis Doctorado Ciencias Biológicas, 2016). Los efectos obtenidos en la reversión de los efectos del etanol fueron parciales, por lo tanto, se decide continuar con la búsqueda de nuevas moléculas, utilizando como estrategia la sustitución bioisostérica en M554 y M890. Además, se estudió la estructura de la molécula M809a, debido a que esta molécula disminuye significativamente la potenciación del GlyR por etanol (San Martín *et al.*, 2016), al igual que M554 y M890.

### **Búsqueda de nuevas moléculas basándose en principios bioisostéricos**

Para el diseño de la nueva generación de moléculas se utilizó como primera estrategia la estructura de la molécula bioactiva M554 que ha sido sometida a modificaciones estructurales empleando los principios bioisostéricos. Tradicionalmente, los isómeros son moléculas con el mismo número de átomos y el mismo número de electrones de valencia (Langmuir, 1919). Los bioisómeros afectan los mismos sistemas bioquímicos asociados a los agonistas o antagonistas, por lo tanto, producen propiedades biológicas que están relacionadas entre sí. Entre las utilidades están, mejorar las propiedades de los posibles candidatos a fármacos, como la selectividad o las características de transporte o para eliminar efectos secundarios no deseados, como la toxicidad (Langdon *et al.*, 2010). El bioisosterismo clásico incluye átomos o grupos mono, di y trivalentes, átomos tetrasustituídos y anillos equivalentes (figura 4). El bioisosterismo no clásico incluye además sustituciones de ciclos por grupos acíclicos y sustitución de grupos funcionales. Asimismo, se realizan sustituciones en diferentes átomos o grupos presentes en M554 como se observa en la figura 4.



**Figura 4: Sustituciones bioisostéricas clásicas.** Los grupos en cada fila son equivalentes entre sí (Brown, 2012).

Utilizando este principio y mediante técnicas bioinformáticas como docking molecular se diseñó una caja de simulación sobre la triada de ácidos aspárticos 186, 228 y 246 en G $\beta$  residuos que han sido claves en la búsqueda de ligandos para interferir sobre la potenciación del GlyR. Esta técnica fue utilizada con el propósito de determinar la conformación tridimensional de las moléculas. Luego se procedió con DM de 20 ns con el programa de simulación Amber, obteniendo que las moléculas se mueven desde la zona inicial de triada aspártica hacia el poro de la proteína G $\beta\gamma$ , por lo tanto, se extiende el tiempo de simulación en 70 ns totales, con el fin de obtener una certera simulación temporal del sitio de asociación de los estereoisómeros de M554 y enantiómeros de M890. Los resultados indican que la molécula (R,R)-M554 presenta mejor puntuación en los estudios de energía libre de unión MM-GBSA tendencia que se mantiene en los ensayos realizados *in vitro*, de esta manera se utiliza esta molécula para identificar nuevo ligandos. A partir de (R,R)-M554 aplicando el mismo procedimiento descrito con anterioridad para esta molécula, se identifican cinco moléculas análogas más favorecidas energéticamente y que interactúan en el *hotspot* de G $\beta\gamma$ . Las moléculas (R,S)-M554\_3, (S)-M554\_13, (R)-M554\_13, M809\_4 y M809\_5 lograron

establecer interacciones en el *hotspot* de G $\beta$  $\gamma$  en residuos conservados en la familia de proteínas G $\beta$  en especies eucariontes. Frente a esta información se realizaron ensayos de viabilidad celular en la línea celular HEK-293 *in vitro* demostrando que estas nuevas moléculas no inducen muerte celular (Yenifer Argel, Tesis Bioingeniería, 2019). Estos datos nos proporcionan información acerca de una molécula pequeña que podría ser utilizada como molécula líder actuando sobre la proteína G $\beta$  $\gamma$  para inhibir los efectos que induce el etanol a altas concentraciones sobre las corrientes glicinérgicas.

### **Hipótesis**

A partir de estos antecedentes, se propone continuar con la búsqueda de moléculas pequeñas con potencial para interferir en la interacción G $\beta$  $\gamma$  y GlyR con el propósito de ser utilizadas como moléculas líderes en estudios de búsqueda de inhibidores de los efectos que produce el consumo de etanol en condiciones agudas. El grupo de investigación, anteriormente identificó la molécula M554 que fue capaz de revertir parcialmente los efectos que induce el etanol en modelos *in vivo*. Esta información permite continuar con la búsqueda de nuevas moléculas bioisostéricas a partir de (R,R)-M554 de nuevos ligandos. Con esta estrategia se identificaron las moléculas (R,S)-M554\_3, (S)-M554\_13, (R)-M554\_13, M809\_4 y M809\_5 las que han sido sometidas a estudios *in vitro* de viabilidad celular demostrando que no inducen muerte celular, aunque es necesario continuar con otros ensayos para caracterizar los efectos sobre el GlyR y de las células, para ello se plantea la siguiente hipótesis basándonos en la información expuesta:

**“Nuevas moléculas con modificaciones bioisostéricas derivadas de M554 y M890 se comportan como inhibidores de los efectos del etanol sobre la activación del receptor de glicina”.**

## **Objetivo general**

Identificar nuevas moléculas con modificaciones bioisostéricas derivadas de M554 y de M890 capaces de actuar como inhibidores de los efectos del etanol sobre la activación del receptor de glicina.

## **Objetivos específicos**

Con el fin de caracterizar los efectos de las moléculas derivadas de M554 y M890 sobre el receptor de glicina en presencia de etanol se han establecido los siguientes objetivos:

**Objetivo 1: Evaluar los efectos de moléculas pequeñas derivadas de M554 y M890 sobre la funcionalidad sináptica de neuronas espinales en cultivo.**

**Racional:** Considerando los antecedentes expuestos y que el diseño de moléculas pequeñas se basa en la interferencia del dímero  $G\beta\gamma$  sobre la región denominada “*hotspot*” donde interfieren una serie de moduladores implicados en la regulación del  $Ca^{2+}$  y debido a su rol funcional en la sinapsis glicinérgica se propone evaluar el efecto de los ligandos (200 $\mu$ M) sobre el establecimiento de redes y conectividad neuronal en cultivos primarios provenientes de la medula espinal. Se utilizará una sonda fluorescente de  $Ca^{2+}$ , Fluo-4 AM para la detección intracelular de este ion ya que, esto permite estudiar las transitorias de  $Ca^{2+}$ . Mediante un incremento de la excitación de fluorescencia a 488 nm y el consiguiente aumento de los niveles de la señal de fluorescencia. Las células se pueden cargar como éster AM de estos indicadores calcio mediante la adición del indicador disuelto directamente a las placas que contienen las células cultivadas.

## **Actividades:**

1. Preparación de cultivos primarios de medula espinal a partir de embriones de ratones C57BL/6J de 13-14 días.
2. Registros de las transitorias de  $Ca^{2+}$  se realizan a través de la sonda fluorescente Fluo-4-AM en neuronas espinales de 7-10 días de cultivo. Los tratamientos aplicados involucran la incubación de las moléculas, etapa previa a la aplicación de las condiciones de etanol agudo.

**Objetivo 2: Evaluar la coordinación motora de ratones intoxicados con etanol en presencia de las nuevas moléculas derivadas de M554 y M890.**

**Racional:** Debido al rol que el ejerce GlyR en las vías motoras y los reflejos de la médula espinal involucradas en la regulación de la coordinación de la motricidad, se utiliza la técnica de rotarod acelerado para estudiar los tiempos de recuperación en ratones C57BL/6J (*wild type*) bajo condiciones de intoxicación aguda por etanol.

**Actividades:**

1. Fase de entrenamiento de los ratones en el equipo con aceleración durante los días del 1, 2 y el día 3. Además, en el 3 día se aplica la inyección intraperitoneal después del entrenamiento y considerando un tiempo superior a 30 minutos de descanso se aplican las diferentes condiciones; control (salino), etanol (agudo), moléculas y etanol (agudo), evaluando el rol de las moléculas en la reversión de los efectos que induce el etanol mediante el registro de la latencia a caer.

**Objetivo 3: Proponer nuevas sustituciones bioisostéricas clásicas y no clásicas por medio de estudios bioinformáticos para la modificación de M554 y M890.**

**Racional:** A partir de las moléculas mejor evaluadas en los ensayos *in vitro* e *in vivo* se considera su estructura, así como también la de M554 para realizar una serie de cambios basándose en los principios bioisostéricos mediante técnicas bioinformáticas que permitan obtener nuevas moléculas con mejor energía de unión al dímero G $\beta$  $\gamma$  para disminuir los efectos de la activación del GlyR.

**Actividades:**

1. Diseño de estructuras y posterior identificación de la conformación de las moléculas en G $\beta$  $\gamma$  mediante *Visual Molecular Dynamics* (VMD) y docking molecular, respectivamente.

2. Realización de simulaciones computacionales por DM de 70 ns en Amber para conocer el sitio de unión y posteriores cálculos de energía libre por MM-GBSA.

3. Determinación de diferentes tipos de interacciones no covalentes que favorecen la asociación entre los ligandos y la proteína G $\beta$  $\gamma$ .

**Objetivo 4: Efectuar estudios de viabilidad en línea celular con nuevas moléculas análogas a M554 y M890.**

**Racional:** Con el propósito de evaluar la citotoxicidad y proliferación celular a través de la detección y medición de la fluorescencia se utilizó el reactivo Alamar Blue que midió el poder reductor de células vivas por medio de una reacción colorimétrica. Este procedimiento es clave para evaluar la toxicidad de los nuevos ligandos en el diseño de drogas.

**Actividades:**

**1.** Preparación de células HEK-293 que son utilizadas con una confluencia del 80% y que son incubadas con las moléculas en diferentes concentraciones por un periodo de 24 horas. Posterior a la incubación de los ligandos se utiliza el reactivo Alamar Blue para evaluar la sobrevivencia celular mediante la reacción óxido-reducción sólo tiene lugar en las células viables, generando variaciones en la fluorescencia que son registradas.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### ESTUDIOS *IN SILICO*

#### Diseño de moléculas

En la búsqueda de nuevas moléculas se realizaron sustituciones bioisostéricas en las moléculas M554 y M890 utilizando el programa VMD 1.9.3 (Humphrey *et al.*, 1996) en Molefactory complemento usado para construcción y parametrización de moléculas pequeñas. Las estructuras son obtenidas en formato PDB y fueron optimizadas por el programa AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010). Para ejecutar Vina la estructura para los ligandos debió estar en formato “pdbqt” conservando los átomos de hidrógenos polares para disminuir el gasto computacional en el docking molecular.

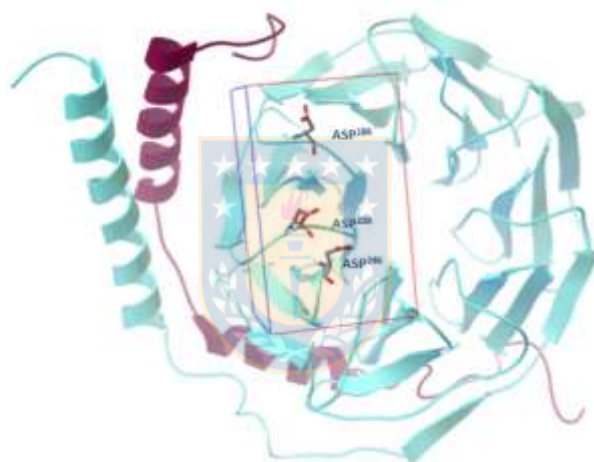
#### Preparación de la proteína G $\beta\gamma$

La estructura del dímero G $\beta\gamma$  es extraída del *Protein Data Bank* PDB (código 1TBG) con una resolución de 2.1 Å (Sondek *et al.*, 1996). Los parámetros de la calidad del modelo atómico se representan por medio del “*R-value free*” con un valor de 0.306 entregándonos información acerca de cómo coincide el patrón de difracción simulado con respecto al patrón de difracción observado experimentalmente con un “*R-value work*” de 0.2, obteniendo una diferencia cercana a 0. Las moléculas de agua de la cristalización son eliminadas para disminuir el tamaño y evitar que las moléculas de agua extras enmascaren la unión ligando-proteína (Rudnitskaya *et al.*, 2010). Además, las cadenas de la proteína se delimitan agregando “TER”; también se revisaron la protonación de las histidinas para luego ser planteadas en el lenguaje de Amber 16 (Case *et al.*, 2005). Los hidrógenos son eliminados y dispuestos solo en moléculas polares para crear el archivo “pdbqt” a utilizar en AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010).

#### Docking molecular

Es el método utilizado para predecir la conformación entre dos moléculas que forman un complejo estable (Malathi & Ramaiah, 2018) posee dos componentes principales: acoplamiento y puntuación. El acoplamiento *per se* implica el muestreo conformacional y orientativo del ligando dentro de las restricciones del sitio de unión en el receptor. La función de puntuación selecciona la mejor postura considerando la conformación de ligando y

orientación (Yuriev *et al.*, 2011). Para analizar el modo de unión entre las moléculas y el dímero G $\beta$  $\gamma$  hemos utilizado el programa AutoDock Vina 4 versión 1.5 (Trott & Olson, 2010). El algoritmo de búsqueda local utilizado por Autodock emplea una búsqueda estocástica que genera conformaciones al azar. Vina, en cambio calcula un gradiente mientras busca un óptimo local (Chang *et al.*, 2010). El modelo de interacción propuesto se ha realizado manteniendo la proteína rígida y los ligandos como moléculas flexibles que se mueven alrededor de una rejilla. Se utiliza el programa auxiliar AutoGrid 4 para generar los mapas de cuadrícula, las dimensiones de la caja de rejilla son de 36x64x40 Å alrededor del sitio activo que incluye una triada de ácidos aspárticos (ASP186, ASP228 y ASP246) sobre el dímero de G $\beta$  $\gamma$  centrado en 10x4x10 Å y espaciado de 0.375 Å como se representa en la figura 5.



**Figura 5: Representación de la estructura del dímero G $\beta$  $\gamma$  usado en el docking molecular.** Se destacan las dos cadenas de la proteína G $\beta$  $\gamma$ . En color celeste la cadena  $\beta$ , en morado la cadena  $\gamma$  en la zona central se destacan en la caja la triada de ácidos aspárticos ASP186, ASP228 y ASP246.

### **Ensamblaje de los complejos G $\beta$ $\gamma$ -moléculas**

Para este sistema se utilizan las coordenadas de las moléculas y del dímero G $\beta$  $\gamma$  obtenidas desde el docking molecular. Los valores de las cargas parciales de los átomos de los ligandos se reasignan a partir del módulo Antechamber del programa AMBER 16 (Case *et al.*, 2005) asumiendo una carga total igual a cero. Se verificaron si todos los parámetros están disponibles por medio de parmchk. Los hidrógenos son eliminados y son nombrados por AMBER por medio de tleap. Se utilizó el campo de fuerza ff14SB y se escogió el modelo de agua TIP3P. Luego se crea una caja de simulación con una distancia máxima entre la



proteína y el borde de la caja de 10 Å, adicionando a Gβγ-moléculas en un sistema ortorrómbico con la cantidad correcta de las moléculas de agua necesarias para solvatar la caja. Además, se añaden iones de Na<sup>+</sup> para neutralizar el sistema; proceso que permitió la creación de los archivos de topología y coordenadas a usar en DM.

### **Dinámica molecular**

La *dinámica molecular* (DM), es una técnica de simulación computacional que estudia la evolución temporal del sistema mediante la integración de las ecuaciones Newtonianas del movimiento. La integración de las ecuaciones produce una trayectoria que describe las posición, velocidad y aceleración de las partículas en función del tiempo. Para las simulaciones de DM se utilizó el programa AMBER 16 (Case *et al.*, 2005) que emplea campos de fuerzas GAFF para moléculas orgánicas y ff14SB para proteínas. Además, incorpora modelos empíricos y heurísticos para estimar las constantes de fuerza y las cargas atómicas parciales (Wang *et al.*, 2004). El proceso previo a la simulación inicia con una minimización sistemática de energía para todos los átomos del sistema, ejecutando un paso de minimización mediante el método de descenso abrupto de 10.000 pasos usando un valor de corte de 10 Å. Posteriormente, el sistema es sometido a una fase de equilibrio donde se aumenta la temperatura desde 0 K con incrementos de 10 K hasta alcanzar los 300 K y son almacenados cada 5.000 pasos la trayectoria de los átomos del sistema que posee en total 60.000 pasos, se utilizó un volumen constante usando el algoritmo termostato de Langevin en 0,12 ns. Por último, el paso de producción se llevó a cabo durante un tiempo de 20 ns iniciales donde se seleccionaron los ligandos mejor evaluados y se alargaron las simulaciones en 50 ns (Etapa donde se realiza la selección) obteniendo 70 ns totales para las moléculas seleccionadas a temperatura constante de 300 K. Las trayectorias son registradas cada 50.000 pasos para la simulación de 20 ns con 10.000.000 de pasos totales y cada 100.000 pasos se almacenaron las trayectorias con un total de 25.000.000 para la dinámica de 50 ns de extensión. Se calculó el RMSD con el software VMD versión 1.9.3 (Humphrey *et al.*, 1996) se consideran los Cα (*Backbone*) para la proteína Gβγ y para las moléculas se incluyen los hidrógenos (*Noh*) en este cálculo.

## Cálculos de energía libre por MM-GBSA

El cálculo de energía libre se realizó por el método *Mecánica Molecular-Área de Superficie Generalizada de Born* (MM-GBSA) método basado en la mecánica estadística para obtener la energía libre de unión entre G $\beta$  $\gamma$ -moléculas. La energía total ( $E_{tot}$ ) de una molécula solvatada se calcula a partir de la energía de la molécula en el vacío ( $E_{vac}$ ) y la energía libre de transferir por la molécula del vacío al disolvente ( $\Delta G_{solv}$ ).

$$E_{tot} = E_{vac} + \Delta G_{solv} \quad (1)$$

A continuación, asumimos  $E_{vac}$  está representada por una función potencial clásica que divide la interacción en varios componentes físicos, como el enlace y el ángulo de estiramiento, el giro torsional y las interacciones de Van der Waals (VDW) y Coulomb entre sus átomos. Para estimar la energía libre de solvatación total de una molécula  $\Delta G_{solv}$  se puede descomponer en las partes "electrostática" y "no electrostática":

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{el} + \Delta G_{surf} \quad (2)$$

El  $\Delta G_{surf}$  es la energía libre de solvatar una molécula de la cual se han eliminado todas las cargas y el  $\Delta G_{el}$  es la energía libre de eliminar primero todas las cargas en el vacío, y luego volver a agregarlos en presencia del solvente. El cálculo de la parte electrostática considera a cada átomo como una esfera de radio  $R_i$  con una carga  $q_i$  donde  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos  $i$  y  $j$ , los  $R_i$  son los radios Born efectivos de los átomos  $i$  y  $j$ , y  $f^{GB}$  es una función suave (Onufriev *et al.*, 2004) e incorpora los argumentos antes descritos.

$$\Delta G_{el} \approx \Delta G_{GB} = -\frac{1}{2} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{f^{GB}(r_{ij}, R_i, R_j)} \left( 1 - \frac{e^{-k f_{ij}^{GB}}}{\epsilon_w} \right) \quad (3)$$

La metodología de MM-GBSA están incluidas en el paquete AMBER 16 mediante el programa mmpbsa.py y las contribuciones a la energía libre son calculadas utilizando el módulo SANDER extrayendo los parámetros desde los archivos de trayectoria (*mdcrd*) y topología (*prmtop*) en una DM de 20 ns y en los siguientes 50 ns. Para el método GB se utiliza la aproximación Onufriev (igb=5) (Onufriev *et al.*, 2004).

## Interacción G $\beta$ $\gamma$ -moléculas

Para la asociación a G $\beta$  $\gamma$  se consideraron interacciones no covalentes como, los puentes de hidrógeno ya que desempeñan un papel crucial en la determinación de la especificidad de la unión, para ellos se hace un monitoreo de los enlaces de hidrógeno a lo

largo de las trayectorias de los 50 ns finales de la simulación de 70 ns considerando distancias y ángulos de corte de 3.0 Å y 20°, respectivamente (Gerlt *et al.*, 1997). Los análisis se realizan por VMD 1.9.3 (Humphrey *et al.*, 1996) con la extensión *labels*. De igual forma, se buscan interacciones de Van der Waals (dipolo-dipolo, ión-dipolo, dipolo-dipolo inducido) y interacciones  $\pi$ - $\pi$  de apilamiento, especialmente si la molécula del fármaco y un receptor tienen conformaciones tridimensionales complementarias, por lo tanto, para este caso se toman distancias menores o iguales a 5 Å (Gallivan & Dougherty, 1999). Entre las interacciones electrostáticas a estudiar serán los puentes salinos considerando distancias menores o iguales a 4 Å (Bosshard *et al.*, 2004).

## **ESTUDIOS *IN VITRO***

### **Cultivos y líneas celulares**

Las células HEK-293 (Human Embryonic Kidney cells) fueron cultivadas al 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> a 37°C en DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Hyclone). Las neuronas espinales se obtuvieron desde ratones C57BL6/J las cuales se siembran a 300.000 células/ml en placas de cultivos de 35 mm cubiertas con poli-L-lisina (PM 350 kDa) y fueron utilizadas en el día 8-10 de cultivo en medio feeding neuronal (95% Medio mínimo esencial (MEM, GIBCO, Rockville, MD), 5% suero de caballo inactivado con calor (GIBCO) y una mezcla de suplementos nutritivos.

### **Transientes de Ca<sup>2+</sup>**

Las Transitorias corresponden a las fluctuaciones en las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. Este experimento se realizó en neuronas espinales embrionarias que son utilizadas en ensayos transcurrido 8-10 días desde su obtención incubándose con la sonda fluorescente Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific, USA) a 5 µM con 1 ml de *Solución Externa Normal* (SEN) (NaCl 150 mM; KCl 5,4 mM; CaCl<sub>2</sub> 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; Glucosa 10 mM; HEPES 10 mM; Sacarosa 50 mM) por 30 minutos a 37 °C protegidas de la luz. Posteriormente, se realizó dos lavados con SEN, para incubar luego realizar un tercer lavado por 30 minutos con 1 ml de SEN, en este punto se aplicó el tratamiento incubándose las moléculas a 200 µM bajo las mismas condiciones anteriores. Este tiempo fue seleccionado debido a que anteriormente se demostró que las moléculas M554 y M890 ingresan al interior de la célula en un tiempo de 15 minutos como mínimo (Loreto San Martín, Tesis Doctorado

Ciencias Biológicas, 2016). Al término de estos 30 minutos son llevados en un pocillo NUNC con 2 ml al microscopio de fluorescencia invertida (Eclipse TE; Nikon, Japón) equipado con una lámpara de Xenón y un objetivo de 40x (22°C-24°C), en este periodo en que se agrega el etanol (99%) en el medio hasta obtener una concentración final de 100 mM para realizar los registros. Las células fueron iluminadas durante 200s con un filtro Lambda 10-2 controlada mediante el computador después de haber seleccionado las regiones de interés (soma neuronal) que contienen la fluorescencia de Fluo-4 AM (Excitación de 480 nm y de Emisión de 510 nm) en campos que suelen registrar más de 6 células. Las imágenes recolectaron intervalos de 1s durante un periodo continuo de 200s de grabación con una cámara SensiCam de 12 bits. Estos datos se adquirieron y analizaron mediante el software Imaging Workbench 6.0 (INDEC BioSystems, Santa Clara, CA, USA).

### **Viabilidad celular**

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizó el reactivo Alamar Blue, que es un compuesto permeable, no tóxico, que mide el poder reductor de células vivas. Las células vivas reducen resazurina (componente azul no fluorescente del reactivo) a resorufina, componente rojo altamente fluorescente que se mide por espectrofotometría. Se evaluaron las diferentes condiciones por 24 horas como; control positivo con DMEN al 10% de suero bobino fetal FBS, control negativo con Tritón X-100 (0.1%), DMSO (1%, 2% y 5%) y las moléculas análogas de M554 y M890 se estudiaron a tres concentraciones distintas de 50  $\mu$ M, 200  $\mu$ M y 500  $\mu$ M para la medición se adiciono el reactivo Alamar Blue (Invitrogen) al 10%, incubándose durante 2 horas a 37°C, protegido de la luz. La medición de fluorescencia se realizó usando un lector de fluorescencia (NOVOstar, BMG Labtech) utilizando una longitud de onda de absorción de 544 nm y emisión a 590 nm. Los valores obtenidos de intensidad de fluorescencia se graficaron con respecto al porcentaje del control.

## **ESTUDIOS *IN VIVO***

### **Animales**

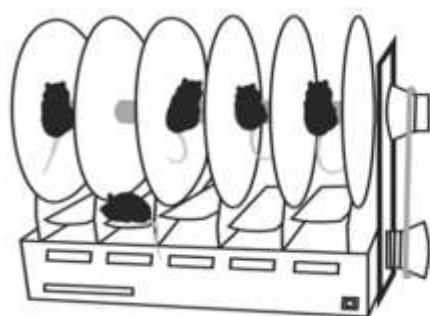
Los animales a utilizar en ensayos de comportamiento corresponden a ratones machos C57BL6/J y han sido usados en estudios previos con una edad aproximada de 9-14 semanas y con un peso de 20-30 g (San Martín *et al.*, 2016). El cuidado de estos animales y los protocolos de experimentación en los ensayos de comportamiento se rigen por la normativa

de la Universidad de Concepción y conducidos de acuerdo a los protocolos éticos establecidos por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) y la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID).

### **Ensayos de rotarod acelerado**

La prueba de rotarod acelerado es un test de comportamiento que evalúa el rendimiento de la coordinación motora basal, en el cual el animal es situado en una barra horizontal que rota alrededor de su eje longitudinal donde el animal debe caminar para no caer. El tiempo que el animal es capaz de mantenerse sobre el cilindro rotatorio o latencia de caída entrega una medida de su coordinación motora (Shiotsuki *et al.*, 2010).

Brevemente, los ratones C57/BL6J machos son ubicados en la rueda en reposo (IITC Life Science Inc, CA) que rápidamente comienza a acelerar desde 4 hasta 40 rpm en un tiempo de 120 segundos, registrando el tiempo y la latencia a caer. Los primeros 3 días son de entrenamiento de cinco repeticiones cada tres minutos por día y las diferentes condiciones se evaluaron el tercer día posterior al entrenamiento, que corresponden al control, etanol (2,0 g/kg i.p.), moléculas (100 mg/kg i.p.) y etanol/moléculas (100 mg/kg y 2,0 g/kg i.p.) se inyectaron de forma intraperitoneal previo a la prueba los registros de las condiciones se realizan transcurridos 15 minutos después de la inyección.



- Ctrl +
- EtOH
- Moléculas
- EtOH/Moléculas

**Figura 6: Protocolo rotarod acelerado.** Equipo utilizado para realizar el procedimiento con los ratones durante los días del 1, 2 y el día 3 de entrenamiento registrando la latencia a caer luego de ser administradas las inyecciones.

## Moléculas análogas a M554 y M890

Las moléculas análogas fueron facilitadas por *Research Triangle Institute* RTI para continuar con el análisis de moléculas que interfirieran en los efectos causados por el etanol sobre el GlyR. Se prepararon stock de 5 mM de las moléculas M809\_4, M809\_5, (R,S)-4M554\_2, (R)-2T\_181 y 2T\_175 (mezcla racémica) con *dimetilsulfóxido* DMSO al 10%, luego, se añade lentamente *Phosphate-Buffered Saline* PBS mientras se va agitando la mezcla, cuando se encuentran disueltas son almacenadas a -20°C las moléculas análogas a M890 y a -4°C para los análogos de M554. Para los ensayos realizados *in vitro* de viabilidad celular con (R,S)-4M554\_2, (R)-2T\_181 y 2T\_175 (mezcla racémica) se prepararon en el medio celular DMEM a 200 uM en una concentración de DMSO del 0,4%. En él estudió de las transitorias de Ca<sup>2+</sup> se trabajó a una concentración de 200 uM al 0,4% de DMSO con M809\_4 y M809\_5 preparadas en SEN. En los ensayos *in vivo* se preparan las moléculas M809\_4 y M809\_5 con *hidroxipropil β-ciclodextrina* (HP-β-CD) compuesto que favorece la solubilización formación del complejo de inclusión con los ligandos. Para la disolución se disuelve la hidroxipropil β-ciclodextrina presente en una proporción de masa 1:20 en solución salina (0,9% NaCl) y luego las moléculas son adicionadas con DMSO al 0,8% en agitación y son mantenidas una temperatura de 40°C hasta la disolución final. Para los controles de los experimentos se utilizaron las mismas condiciones de disolución sin las moléculas.

## Análisis de datos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prisma 7. Los resultados son expresados en promedio ± S.E.M para los ensayos de Ca<sup>2+</sup> y en los ensayos *in vivo*. Para los ensayos de viabilidad celular se muestra el promedio ± desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizan mediante los análisis de varianza (*one-way* ANOVA o *two-way repeated* ANOVA) seguido de análisis *post hoc* de Bonferroni o Tukey, en donde los valores de p<0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos. Los rangos de significancia se evalúan: no significancia p<0,1; “\*” p<0,033; “\*\*\*” p<0,0021 y “\*\*\*\*” p<0,00021.

## RESULTADOS

El presente estudio tuvo como propósito identificar moléculas pequeñas capaces de disminuir los efectos del etanol mediante la unión a la proteína G $\beta\gamma$  clave en la potenciación del receptor de glicina. En este sentido, se realizaron ensayos en modelos celulares de conectividad neuronal y en modelos *in vivo* donde se analizó la capacidad de coordinación motora de ratones intoxicados con etanol.

### Medición de transitorias de Ca<sup>2+</sup> en neuronas espinales

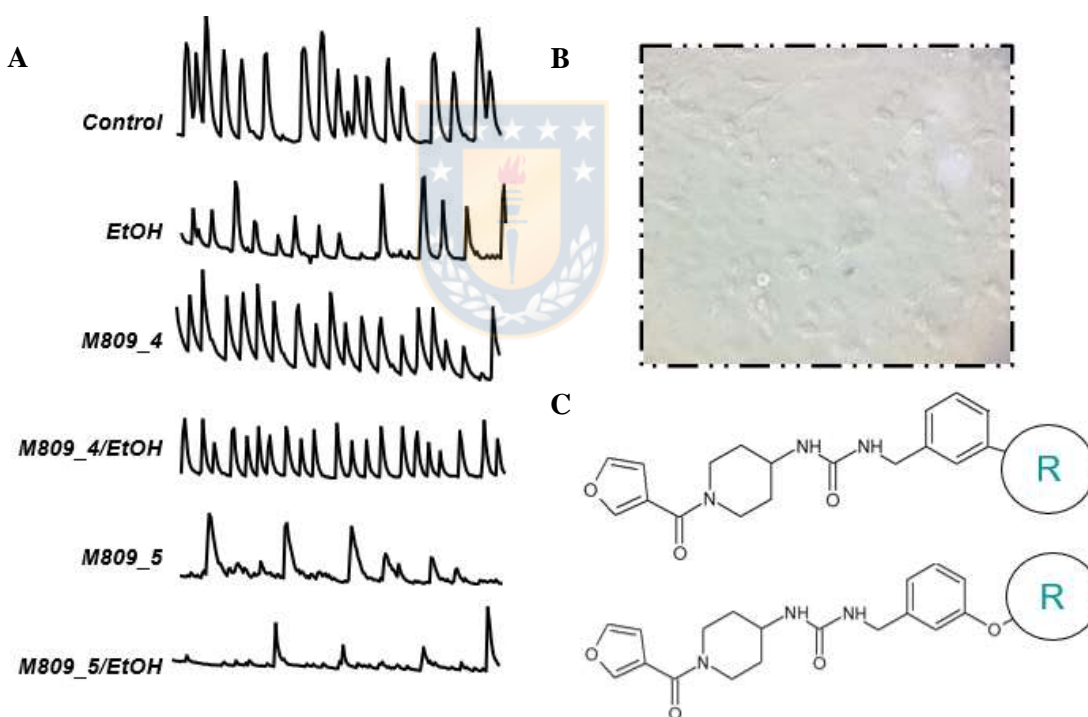
Uno de los parámetros determinantes relativos a la conectividad sináptica son los incrementos de Ca<sup>2+</sup> intracelular, ya que, en el caso de las neuronas, representan la funcionalidad de las conexiones sinápticas en una red. Para evaluar los efectos sobre la conectividad sinápticas ligada a la presencia de etanol en condiciones agudas y el efecto de las moléculas se registró las transitorias de Ca<sup>2+</sup> sobre el cultivo primario de neuronas espinales. Para comenzar este estudio, que se caracterizó por la aparición de la actividad sináptica *in vitro*, los registros permitieron detectar actividad sináptica espontánea desde el día 8 hasta el día 10 de cultivo como máximo periodo en que presentan mayor actividad y la red neuronal es capaz de responder a estímulos del ambiente. Por lo tanto, se contempló este periodo para el registró de cambios ligados a la frecuencia en las transitorias con el tratamiento con moléculas pequeñas para así representar la actividad sináptica bajo las condiciones de este ensayo.

De esta manera, neuronas espinales de cultivos primarios de ratón fueron incubadas con las moléculas M809\_4 y M809\_5. Por otro lado, las moléculas (S)-M554\_13 y (R)-M554\_13 presentaron dificultades de solubilidad, siendo incompatibles con los ensayos realizados. Mientras que la molécula (R,S)-M554\_3 presento toxicidad junto con problemas ligados a la solubilidad, por lo tanto para esta tesis son descartadas. Las concentraciones de las moléculas fueron de 200  $\mu$ M y para el etanol (EtOH) de 100 mM estas concentraciones fueron seleccionadas por estudios previos del laboratorio.

En las mediciones de Ca<sup>2+</sup> en las células espinales se utilizó un indicador de calcio permeable en las células y que se une al Ca<sup>2+</sup> generando una fluorescencia, donde las células se pueden cargar como éster AM de estos indicadores de calcio mediante la adición de Fluo-4 en la placa.

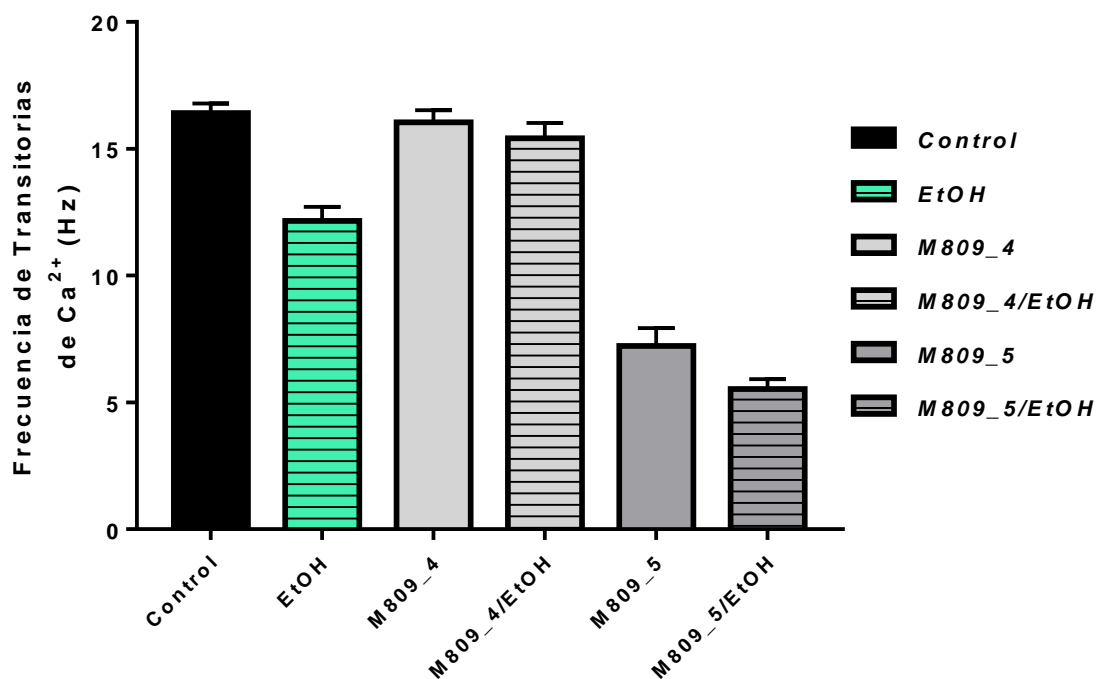


De esta forma, los resultados indicaron que en las condiciones control se obtiene una frecuencia de  $16 \pm 0,6$  número de transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular lo que se define como la condición basal (100%) en neuronas espinales de 8 a 10 días de cultivo (Figura 8). El estudio de los efectos de la aplicación aguda de etanol produjo disminución en la frecuencia de las transitorias obteniendo un porcentaje de disminución de un  $22\% \pm 4\%$  comparado con la condición control. Un efecto más marcado se observó al tratar las neuronas con la molécula M809\_5 obteniendo una reducción de un  $56\% \pm 4\%$  de la frecuencia, resultado que se ve potenciado al adicionar etanol obteniendo un descenso abrupto de un  $67\% \pm 2\%$  en las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tal disminución quedó reflejado en las figuras 7 y 8. No obstante, la molécula M809\_4 por sí sola o en presencia de etanol no parece alterar las fluctuaciones de este segundo mensajero.



**Figura 7: Análisis de transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular obtenidos en neuronas espinales de ratón en el tratamiento agudo con etanol.** A) los registros de las transitorias durante un periodo de 200 s que dura el registro del ensayo con etanol y la respuesta de las neuronas en presencia de las moléculas M809\_5 y la molécula M809\_4. B) neuronas espinales en el día 9 de cultivo. C) la estructura que mantienen en común las dos moléculas utilizadas en este ensayo.





**Figura 8: Cuantificación de transitorias de Ca<sup>2+</sup> intracelular en neuronas espinales debido a la intoxicación aguda por etanol.** Gráfico con la cuantificación de las transitorias de Ca<sup>2+</sup> en diferentes condiciones. Las neuronas espinales, fueron incubadas por Fluo 4-AM y fueron sometidas a una serie de lavados donde se procedió con la incubación de las moléculas indicadas y posterior aplicación del tratamiento con etanol (ver sección de Materiales y Métodos). Del registro de transitorias de Ca<sup>2+</sup> se calculó la frecuencia de transitorias graficados como frecuencia por segundo (Hz). Del análisis se obtuvo una disminución aparente en la frecuencia en presencia de etanol (100 mM) administrado de forma aguda. En el caso de la molécula M809\_4 (200 uM) no se apreciaron diferencias relevantes con respecto al control, por el contrario en la molécula M809\_5 (200 uM) mostró una marcada disminución en las transitorias respuesta que se ve aumentada en presencia de etanol. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM. (n=2)

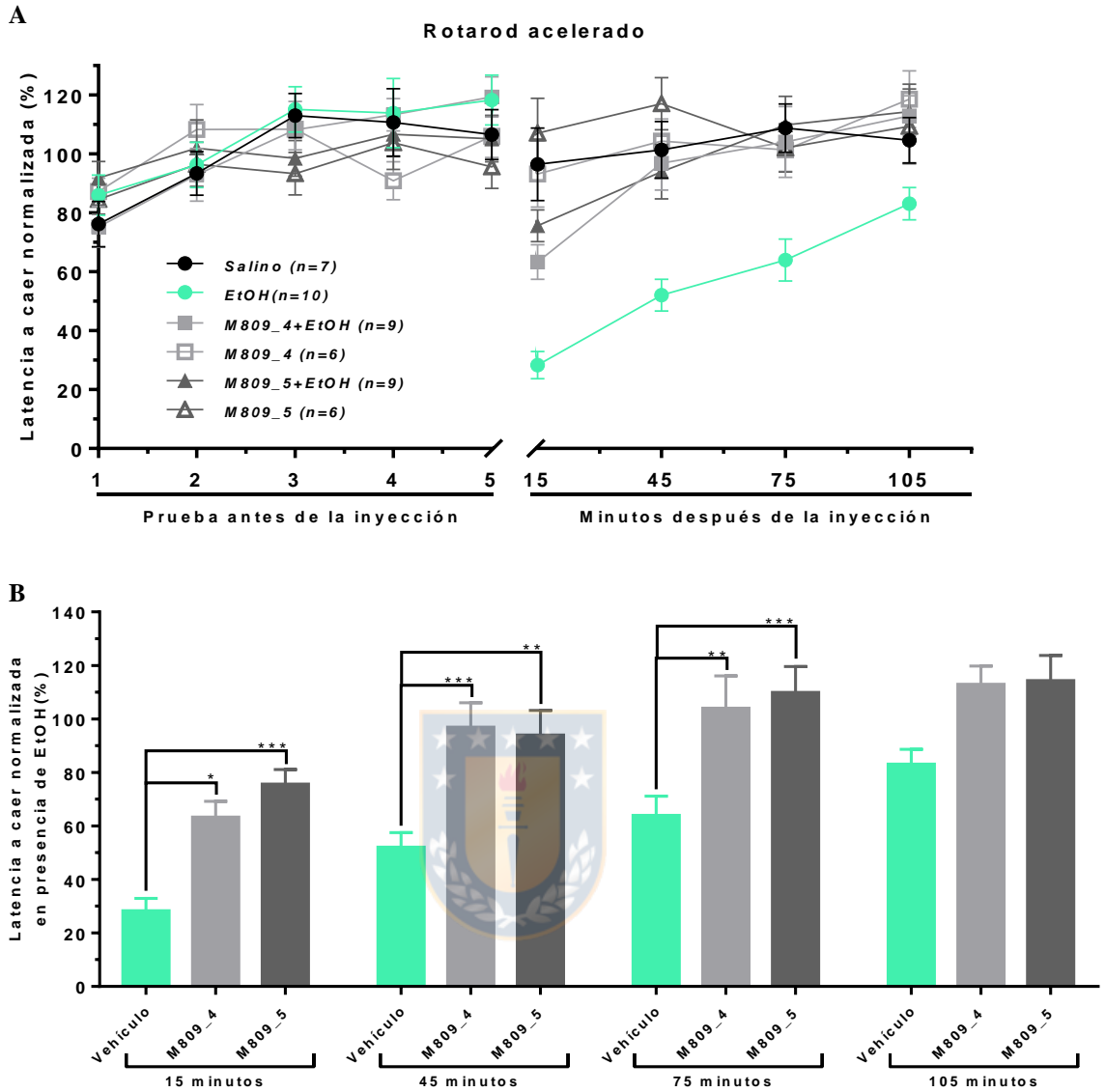
### **Recuperación de la coordinación motora mediante rotarod acelerado**

De acuerdo al diseño racional de las moléculas que se examinaron, los efectos de etanol en coordinación motora debieran verse afectados por el suministro de dosis de estas moléculas. Para él estudio de la recuperación de la coordinación motora luego de la administración de etanol (2,0 g/kg) por inyección intraperitoneal (i.p.), se utilizó la técnica de rotarod acelerado (las condiciones del experimento y de los controles se detallan en Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos demostraron el efecto del etanol sobre la coordinación motora, lo que se reflejó en una reducción del tiempo de latencia a caer con un valor de  $28\% \pm 4\%$  para el grupo de animales tratados con etanol. El grupo de animales suministrado con solución salina mantuvieron mayor desempeño en el eje rotatorio en niveles de un  $97\% \pm 11\%$ , estos datos fueron tomados a los 15 minutos de la inyección i.p.

Con respecto a los animales que recibieron una dosis de las moléculas, la recuperación de la pérdida de coordinación motora fue más rápida en presencia de las moléculas M809\_4 y M809\_5, significativamente.

Este ensayo consto de un periodo de entrenamiento de tres días previo al registro de datos donde se contrasto los efectos sobre la coordinación motora en presencia y ausencia de las moléculas (100 mg/kg i.p.) mediante el rotarod acelerado, las moléculas fueron aplicadas en conjunto con HP- $\beta$ -CD para mejorar la solubilidad de los compuestos, además se utilizó esta molécula en los controles salinos. La normalización se comparó con una condición basal correspondiente al promedio de la latencia a caer durante el entrenamiento para cada animal. El resultado de este estudio, así como las condiciones evaluadas en el tiempo se registran en la gráfica de la figura 9.



**Figura 9: Recuperación de los efectos de la intoxicación aguda por etanol en ensayos de rotarod acelerado con ratones C57BL/6J de 9-14 semanas.** A) Se graficó el comportamiento de los ensayos de rotarod acelerado en grupos de ratones C57BL/6J a los que se les administró etanol (2,0 g/kg), solución salina (NaCl al 0,9%), las moléculas M809\_4 y M809\_5 (100 mg/kg) o las moléculas mencionadas más etanol. Se realizaron cinco registros antes y cuatro después de la i.p. y los datos fueron registrados cada 30 minutos (15, 45, 75 y 105 minutos) cuantificando la coordinación motora a caer del equipo. La data se normalizó con respecto a la condición basal de cada animal. B) Se comparó el efecto de las moléculas sobre la recuperación de la disminución de la capacidad motora causada por etanol en los grupos; etanol (2,0 g/kg) y las moléculas M809\_4+EtOH y M809\_5+EtOH (100 mg/kg de molécula). Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM (*Two-Way* ANOVA test Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

Los resultados indican que después de los 15 minutos de la administración intraperitoneal de etanol en los ratones (grupo EtOH) se produjo incoordinación motora con una latencia a caer reducida en un valor de  $28\% \pm 4\%$  con respecto al entrenamiento previo, no obstante, en los animales tratados con la molécula M809\_4+EtOH se registró una latencia a caer de un  $63\% \pm 6\%$ , muy similar al efecto causado por la molécula en el grupo M809\_5+EtOH con un porcentaje de  $76\% \pm 5\%$  obteniendo una mejor motricidad en los animales.

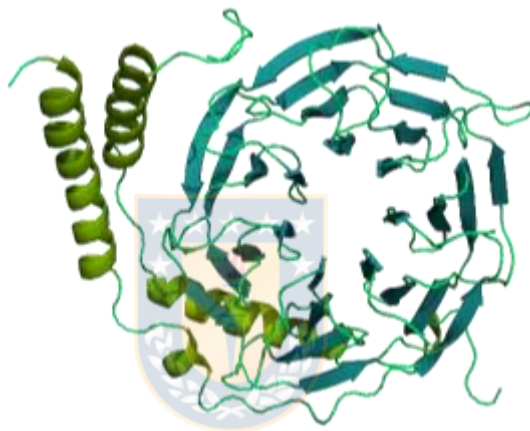
Luego de 45 minutos de la administración de etanol y/o moléculas, se mantuvo la tendencia de la recuperación de los ratones tratados con estos compuestos, donde los animales del grupo EtOH registraron un valor de  $52\% \pm 5\%$  de la latencia a caer y los grupos tratados con EtOH y con las moléculas M809\_4 tienen un valor de  $97\% \pm 9\%$  y para M809\_5 se registro un  $94\% \pm 9\%$  lo que represento en una recuperación motora significativa de la intoxicación aguda por etanol. Los valores de latencia para el grupo EtOH a los 75 minutos es de  $64\% \pm 7\%$  la recuperación inducida por las moléculas más EtOH para M809\_4 y M809\_5 entrego un valor de  $104\% \pm 11\%$  y de  $110\% \pm 9\%$ , respectivamente. A los 105 minutos el valor del grupo EtOH es de  $83\% \pm 5\%$  de recuperación y para M809\_4+EtOH tiene un valor de  $113\% \pm 6\%$  muy próxima se encontro a M809\_5+EtOH con un valor de  $114\% \pm 9\%$ . Tales datos se vieron reflejados en la figura 9 (B).

Estos resultados nos indicaron que las moléculas M809\_4 y M809\_5 son capaces de acelerar la recuperación de la incoordinación motora que se produjo por la administración aguda de etanol en el ensayo de rotarod acelerado, lo que se vio reflejado desde los 15 minutos luego de las inyecciones.

### **Búsqueda de nuevos ligandos para interferir sobre el dímero Gβγ**

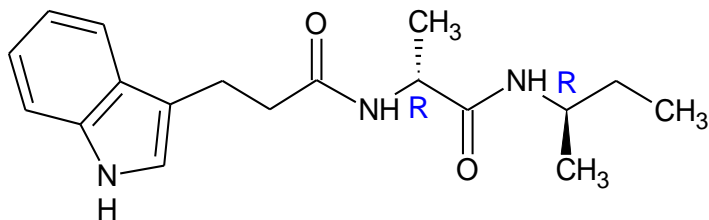
En base a la información de la estructura tridimensional de Gβγ y a las estructuras de las moléculas M809\_4 y M809\_5 se estudió la generación de variantes de estas moléculas introduciendo modificaciones bioisostéricas que aumentaron la energía de unión al dímero Gβγ.

La estructura de la proteína Gβγ que fue utilizada en los estudios *in silico* se resolvió por difracción de rayos X (Sondek *et al.*, 1996; PDB: 1TGB ). La secuencia está compuesta por 408 residuos amoniocídicos y dos cadenas con las isoformas β1γ1 de *Bos Taurus* a una resolución de 2.1 Å (Sondek *et al.*, 1996) como se visualiza en la figura 10 por medio de la estructura secundaria.



**Figura 10: Representación de la estructura del dímero Gβγ.** Representación de la estructura secundaria con código 1TGB del PDB. En color verde se observaron las α-hélices, en celeste los loops y en azul las hojas-β.

La molécula (R,R)-M554 demostró poseer actividad inhibitoria parcial del dímero Gβγ, además, posee en su estructura carbonos con hibridación  $sp^3$  que a su vez se encuentra unido a cuatro grupos distintos, dando lugar a centros quirales que pueden tener configuración R (*rectus*, derecha) o S (*sinister*, izquierda) (Figura 11).

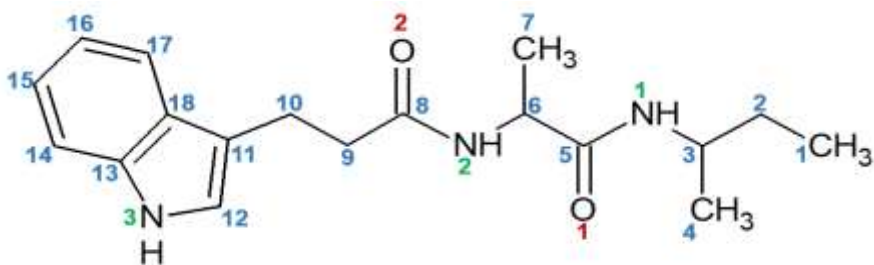


**Figura 11: Molécula (R,R)-M554.** Molécula pequeña que posee un grupo indol en su estructura, en color azul se destacaron los centros quirales con su estequiometría correspondiente.

Al poseer M554 dos centros quirales y ser la molécula con actividad biológica en los ensayos *in vitro* e *in vivo* se hizo necesario estudiar la especificidad de los diferentes diastereoisómeros, obteniendo como resultado que el estereoisómero con mayor actividad inhibitoria correspondió a la isoforma (R,R)-M554 como se detalla en la introducción de este estudio. Además, las moléculas M890 y M809a muestran buenos resultados en los ensayos *in vitro* (Loreto San Martín, Tesis Doctorado Ciencias Biológicas, 2016), por lo que se usó parte de su estructura para continuar con la búsqueda de ligandos.

#### Diseño de moléculas análogas a M554

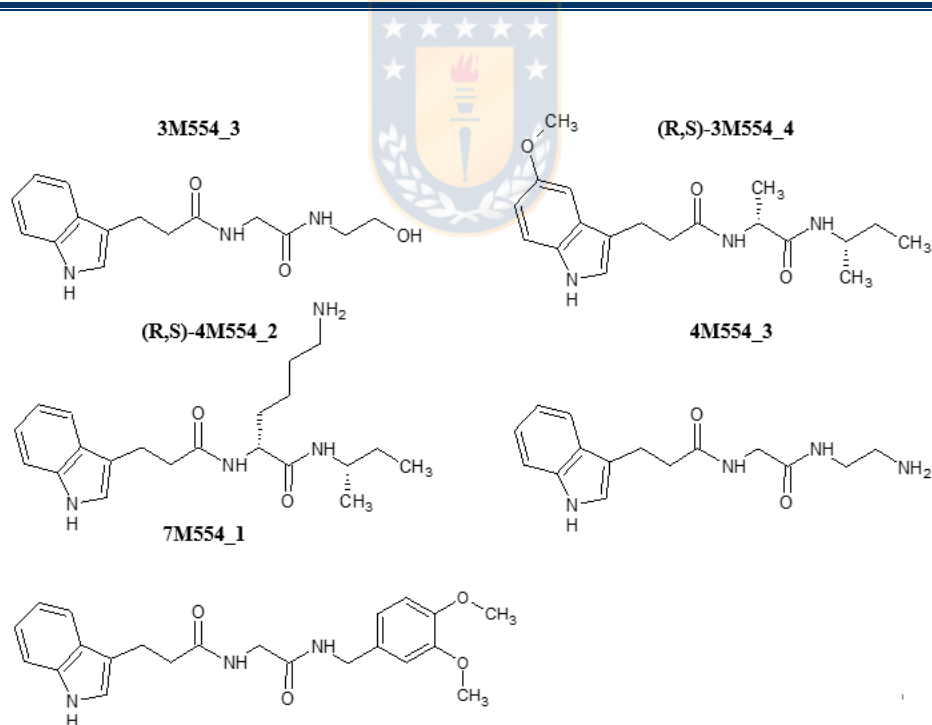
A partir de la estructura de M554 se realizaron cambios bioisostéricos tales como los que se detallaron en la tabla 1. Para simplificar las modificaciones que fueron realizadas en la molécula se numeran los átomos que la componen (figura 12).



**Figura 12: Molécula M554.** Numeración de los átomos de M554 en color azul los carbonos, en rojo los oxígenos y en verde los nitrógenos.

**Tabla 1: Sustituciones bioisostéricas en M554.** Detalles de las modificaciones que se realizaron en la estructura de M554.

Ligandos	Sustitución estructural
3M554_3	Modificación en C <sub>6</sub> y C <sub>3</sub> produciendo perdida de quiralidad y eliminación de C <sub>1</sub> con posterior adición del grupo hidroxilo.
(R,S)-3M554_4	Adición en C <sub>16</sub> de grupo metoxilo. Estructura con quiralidad R y S para sus dos centros quirales.
(R,S)-4M554_2	Eliminación de C <sub>7</sub> y adición en C <sub>6</sub> del grupo butanamina con quiralidad R y S.
4M554_3	Modificación en C <sub>6</sub> y C <sub>3</sub> produciendo perdida de quiralidad y reemplazo de C <sub>1</sub> por un NH <sub>2</sub> .
7M554_1	Modificación en C <sub>6</sub> y C <sub>3</sub> produciendo perdida de quiralidad y eliminación de los átomos C <sub>1</sub> y C <sub>2</sub> . Adición del grupo dimetoxibenceno en C <sub>3</sub> .



**Figura 13: Moléculas análogas M554.** Estructura química de moléculas análogas a M554.

## Docking molecular de análogos de M554

Con el propósito de conocer las conformaciones y coordenadas espaciales de los ligandos se utilizó la técnica de docking molecular que consistió en predecir la estructura tridimensional predominante, favorecida y estable para definir el sistema formado entre las moléculas y la proteína. A partir de este método y con la estructura del dímero G $\beta$  $\gamma$  se seleccionó una región para el docking molecular donde se vio involucrada una tríada de ácidos aspárticos (186, 228 y 246) utilizando el programa Autodock Vina 4 (Trott & Olson, 2010) que procedió realizando una exploración rápida obteniendo una lista de nueve conformaciones posibles ordenadas en torno a la desviación cuadrada media de la raíz RMSD y a la función de puntuación *scoring* como se observa en la tabla 2.

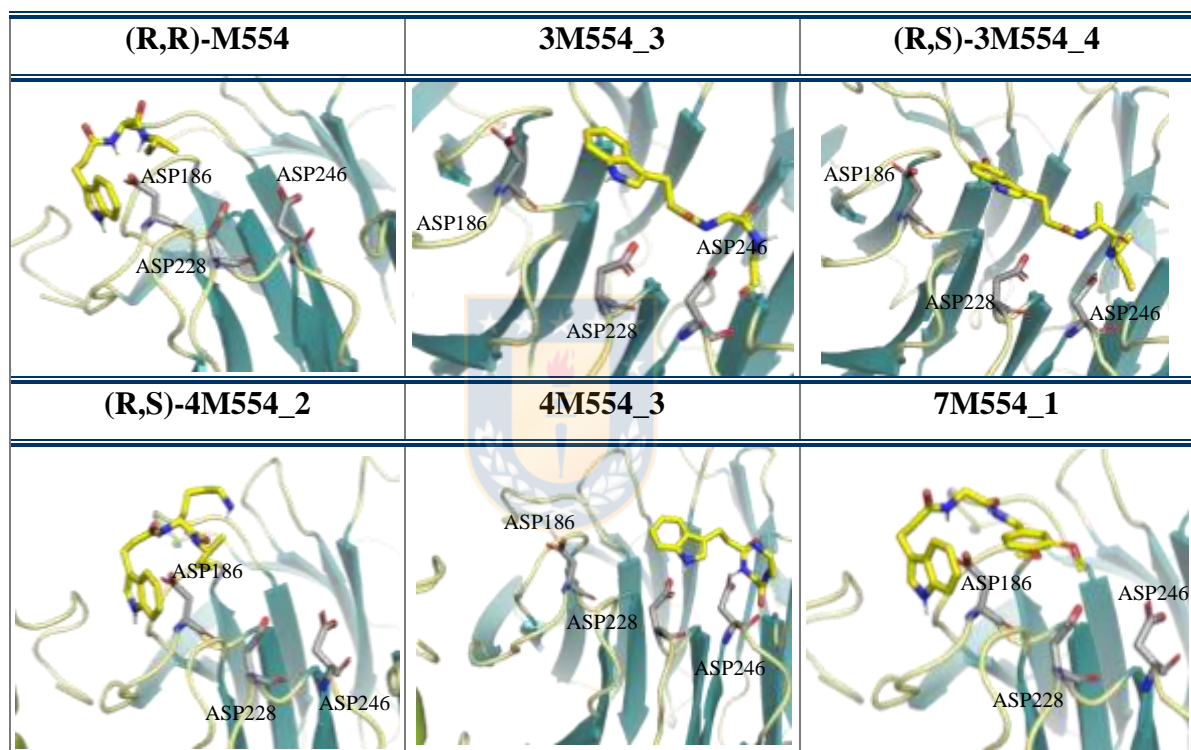
En este sentido, el procedimiento se realizó por medio de un docking flexible para el ligando que posee libertad de movimiento en torno a un espacio limitado según el tamaño de la grilla posicionada sobre el *hotspot* del dímero G $\beta$  $\gamma$ . Por otro lado, la proteína se mantuvo rígida durante el estudio. Dentro del análisis se seleccionó la estructura con la mejor puntuación asignada por Autodock Vina 4 (Trott & Olson, 2010).

**Tabla 2: Evaluación de los bioisómeros de M554.** Puntuación para cada conformación seleccionada en los estudios de docking con Autodock Vina 4.

Ligandos	Puntuación de acoplamiento (kcal/mol)
(R,R)-M554	-3,7
3M554_3	-4,4
(R,S)-3M554_4	-4,6
(R,S)-4M554_2	-3,4
4M554_3	-4,4
7M554_1	-4,3



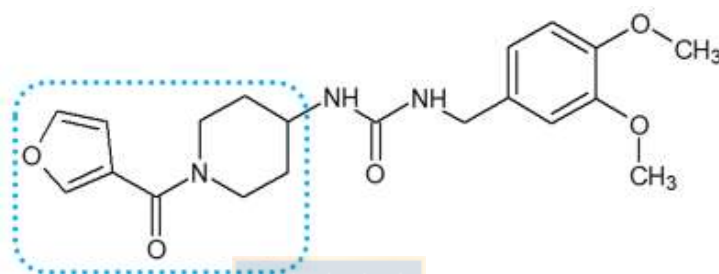
De acuerdo a los análisis de docking descritos en la sección métodos, las posiciones más favorecidas de las nuevas moléculas análogas a M554 y la proteína G $\beta\gamma$  se muestran en la figura 14 con su estructura en color amarillo y manteniéndose en la región seleccionada próxima a ASP186. Una disposición muy similar mantienen las moléculas (R,S)-4M554\_2 y 7M554\_1. Por otro lado, las moléculas 3M554\_3 y (R,S)-3M554\_4 se ubican extendidas sobre el dímero G $\beta\gamma$  disponiéndose en las cercanías de los grupos carboxílicos presentes en los aminoácidos ASP186, ASP228 y ASP246. Mientras que la molécula 4M554\_3 se ubica única en las cercanías de ASP228 Y ASP246.



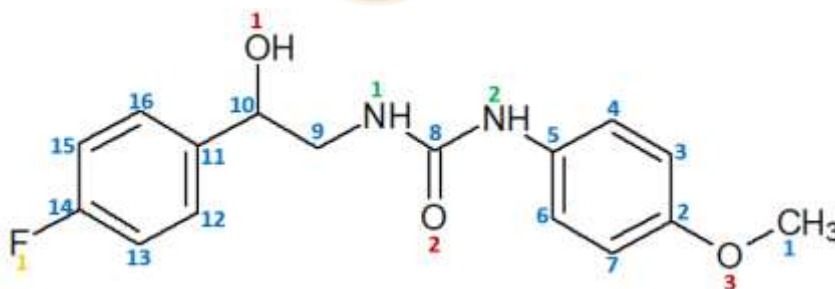
**Figura 14: Complejos G $\beta\gamma$  y análogos de M554.** Conformación de moléculas bioisostéricas entregado por el docking molecular.

## Diseño de moléculas análogas a M890

Para continuar con el diseño de nuevas moléculas las estructuras de M890 y de M809a fueron consideradas para introducir cambios bioisostéricos en su estructura orientados a generar variantes con mayor afinidad a  $G\beta\gamma$ . De esta forma, se realizaron una serie de sustituciones clásicas y otras no clásicas en M890 a la que se le añaden sustituyentes de la molécula M809a debido a que los modelos probados en este trabajo mantuvieron el grupo furano-3-il(piperidina-1-il)metanona (figura 15) presente en los nuevos diseños propuestos (figura 17 y tabla 3), debido a que posee sustituyentes que podrían favorecer la asociación a  $G\beta\gamma$ .



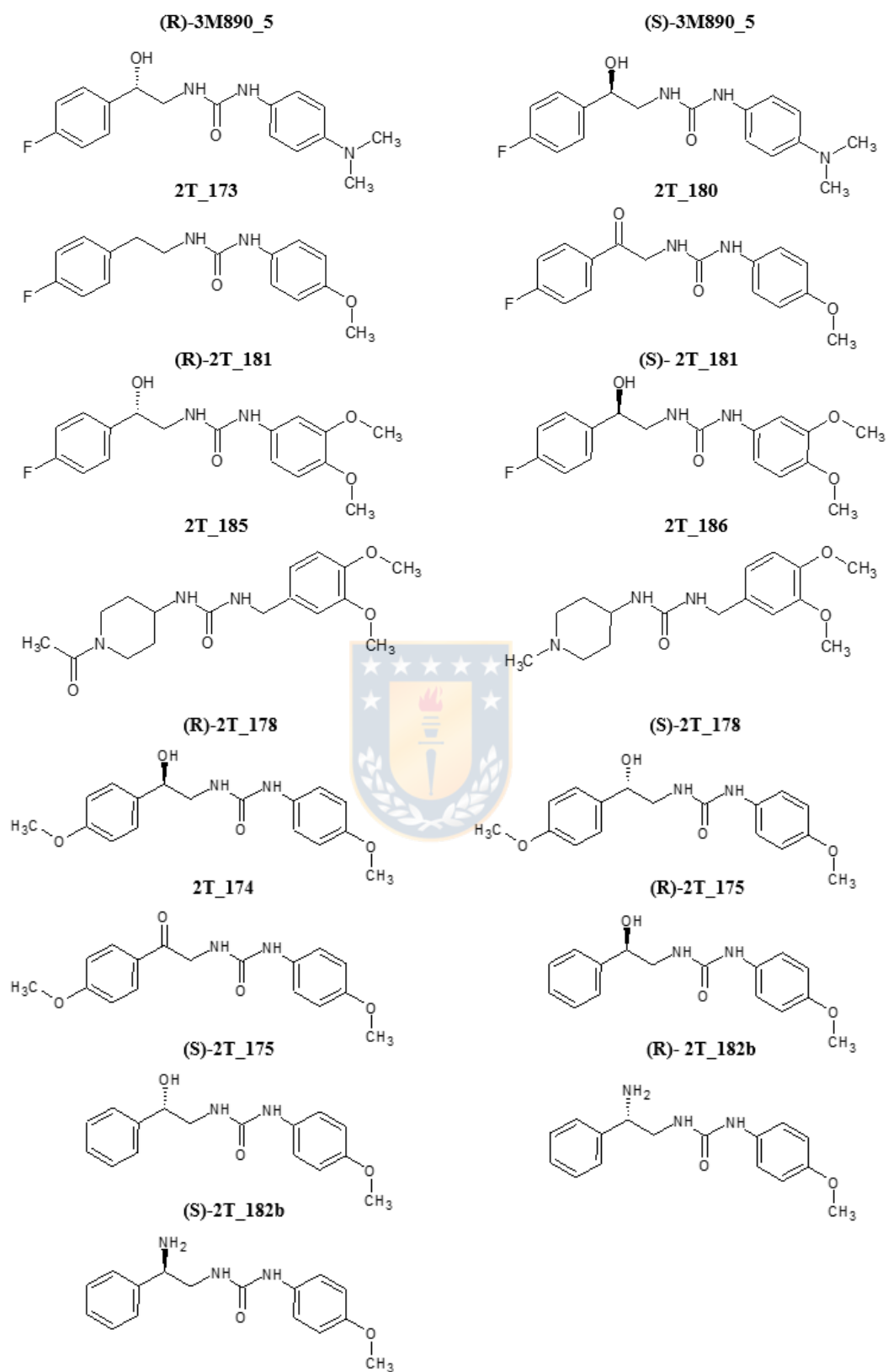
**Figura 15: Molécula M890a.** Estructura química de la molécula M890a donde se destacó en un recuadro punteado el grupo furano-3-il(piperidina-1-il)metanona.



**Figura 16: Molécula M890.** Estructura de la molécula M890 donde se destacó la numeración de los átomos de carbonos en azul, oxígenos en rojo, en amarillo el fluor y en verde los nitrógenos.

**Tabla 3: Sustituciones bioisotéricas en M890.** Detalle de modificaciones que se realizaron en la estructura de M890.

Ligandos	Sustitución estructural
(R)-3M890_5	Eliminación de O <sub>3</sub> y C <sub>1</sub> . Adición en la posición C <sub>2</sub> del grupo dimetilamina. Estequiometria R.
(S)-3M890_5	Eliminación de O <sub>3</sub> y C <sub>1</sub> . Adición en la posición C <sub>2</sub> del grupo dimetilamina. Estequiometria S.
2T_173	Eliminación de grupo hidroxilo presente en C <sub>10</sub> .
2T_180	Cambio de grupo hidroxilo por carbonilo en la posición C <sub>10</sub> .
(R)-2T_181	Sustitución en la posición C <sub>3</sub> por grupo metoxilo. Quiralidad en R en C <sub>10</sub> .
(S)- 2T_181	Sustitución en la posición C <sub>3</sub> por grupo metoxilo. Quiralidad en S en C <sub>10</sub> .
2T_185	Eliminación de C <sub>10</sub> y del grupo fluorobenceno produciendo acortamiento de la estructura. Adición de un C en C <sub>5</sub> . Adición en N <sub>1</sub> del grupo piperidin metanona.
2T_186	Eliminación de C <sub>10</sub> y del grupo fluorobenceno produciendo acortamiento de la estructura. Adición de un C en C <sub>5</sub> . Adición en N <sub>1</sub> del grupo metilpiperidina.
(R)- 2T_178	Reemplazo en F1 por grupo metoxilo. Quiralidad R en C <sub>10</sub> .
(S)- 2T_178	Reemplazo en F1 por grupo metoxilo. Quiralidad S en C <sub>10</sub> .
2T_174	Sustitución en C <sub>10</sub> por grupo carbonilo y reemplazo en F1 por grupo metoxilo.
(R)-2T_175	Eliminación de F1 y reemplazo por H. Quiralidad R en C <sub>10</sub> .
(S)-2T_175	Eliminación de F1 y reemplazo por H. Quiralidad S en C <sub>10</sub> .
(R)-2T_182b	Adición en C <sub>10</sub> del grupo amino. Eliminación de F1 y reemplazo por H. Quiralidad R en C <sub>10</sub> .
(S)-2T_182b	Adición en C <sub>10</sub> del grupo amino. Eliminación de F1 y reemplazo por H. Quiralidad S en C <sub>10</sub> .



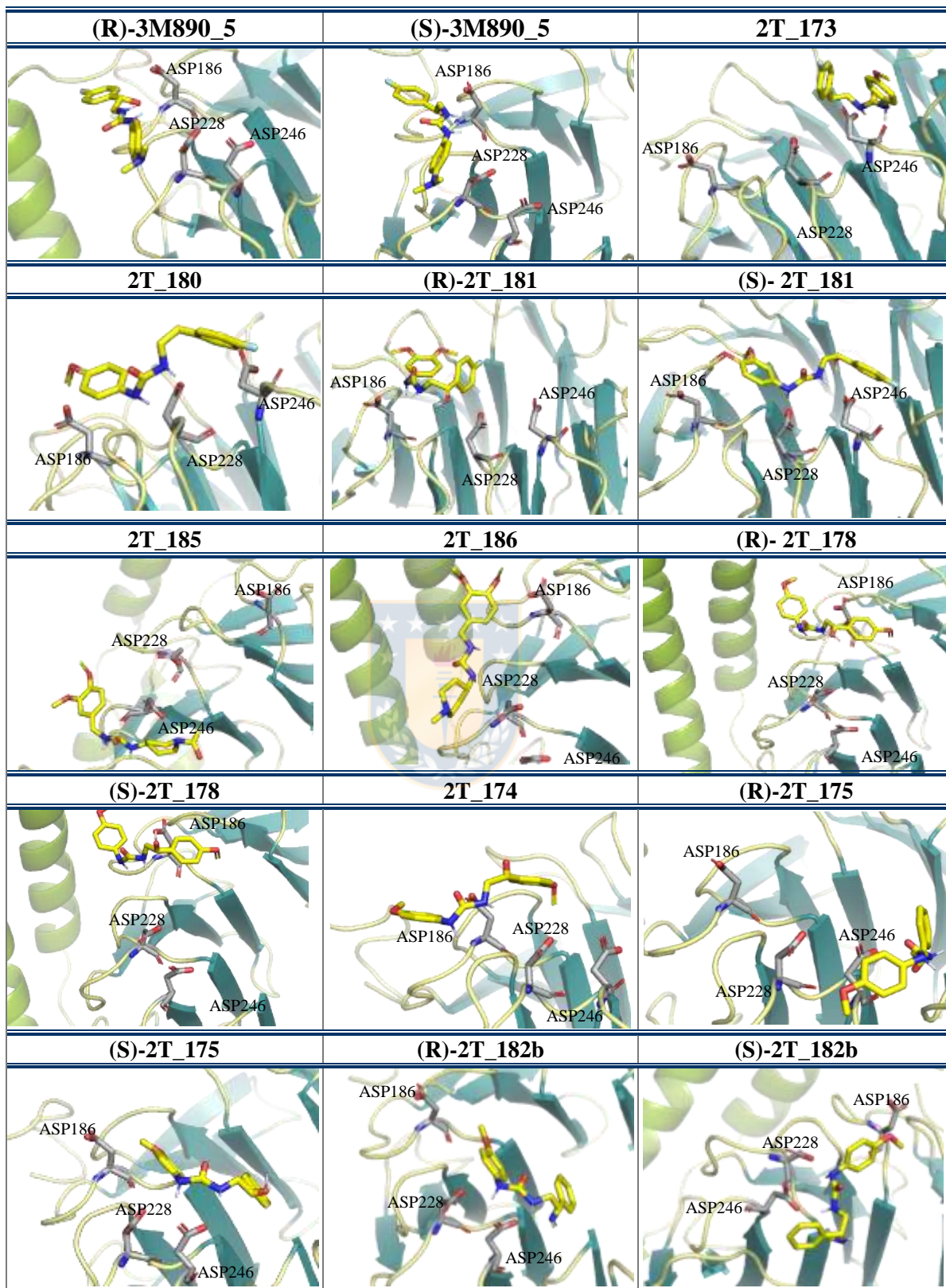
**Figura 17: Moléculas análogas M890.** Estructura química de moléculas análogas a M890.

## Docking molecular de análogos de M890

Para determinar la conformación estructural más probable de las nuevas moléculas diseñadas análogas a M890 y que poseen algunos grupos de M809a se utilizó la técnica de acoplamiento molecular con Autodock Vina 4 (Trott & Olson, 2010) sobre la tríada de ácidos aspárticos en Gβγ. En la tabla 4 se detallaron los valores de acoplamiento para las moléculas diseñadas.

**Tabla 4: Evaluación de los bioisómeros de M890.** Puntuación para cada conformación seleccionada en los estudios de docking con Autodock Vina 4.

Ligandos	Puntuación de acoplamiento (kcal/mol)
<b>R,R-M554</b>	-3,7
<b>(R)-3M890_5</b>	-4,4
<b>(S)-3M890_5</b>	-4,5
<b>2T_173</b>	-4,3
<b>2T_180</b>	-4,2
<b>(R)-2T_181</b>	-3,8
<b>(S)- 2T_181</b>	-4,3
<b>2T_185</b>	-4,8
<b>2T_186</b>	-4,1
<b>(R)- 2T_178</b>	-4,2
<b>(S)- 2T_178</b>	-4,2
<b>2T_174</b>	-4,2
<b>(R)-2T_175</b>	-5,1
<b>(S)-2T_175</b>	-4,1
<b>(R)-2T_182b</b>	-4,2
<b>(S)-2T_182b</b>	-4,2



**Figura 18: Complejos Gβγ y análogos de M890.** Conformación de moléculas bioisostéricas entregado por el docking molecular.

Las posiciones y conformaciones de las moléculas bioisostéricas análogos de M890 se dispusieron en las cercanías de la tríada de ácidos aspárticos de la estructura de  $G\beta\gamma$ . En términos generales, el grupo de moléculas (R)-2T\_181, (R)-2T\_178, (S)-2T\_178 y 2T\_174 se mantuvo a una corta distancia del ASP186. El otro grupo de moléculas que se mantuvieron próximos solo al aminoácido es ASP246 son 2T\_173, 2T\_185 y (R)-2T\_175. Las moléculas (R)-3M890\_5, (S)-3M890\_5, 2T\_186, (S)-2T\_175 se ubicaron sobre la proteína en los residuos ASP186 y ASP228 aminoácidos de interés. Mientras que las moléculas 2T\_180, (S)-2T\_181, (R)-2T\_182b y (S)-2T\_182b se ubicaron en las proximidades de los residuos ASP,186, ASP228 y ASP246. Además, son las que adquieren una conformación estructural similar entre sí posicionándose en el *hotspot* en las cercanías del poro de  $G\beta\gamma$ .





## **Selección de moléculas análogas a M554 y M890 por dinámica molecular y MM-GBSA basándose en (R,R)-M554.**

Para estudiar la evolución temporal y estabilidad de los complejos establecidos en la simulación entre la proteína  $G\beta\gamma$  y las moléculas se utilizó la técnica de DM empleada para el análisis de sistemas biológicos y químicos a nivel atómico en escalas de tiempo de nanosegundos. Entre los programas ampliamente utilizados para realizar DM fue utilizado Amber programa que utiliza campos de fuerzas basados en la mecánica molecular clásica y diseñados principalmente para la simulación de biomoléculas (Case *et al.*, 2005; Salomon-Ferrer *et al.*, 2013).

Debido a que la molécula (R,R)-M554 corresponde al diastereoisómero más activo, se utilizó esta molécula como modelo para buscar nuevos ligandos aplicando los mismos métodos bioinformáticos que permitieron identificar a M809\_4 y M809\_5. Siguiendo esta estrategia de trabajo, inicialmente se realizó una DM como control para la proteína sin ligandos de 20 ns que luego decide extender en 50 ns obteniendo 70 ns finales (Anexo 1) presentando un RMSD menos a 2 Å durante la simulación.

Para continuar, se realizó DM entre  $G\beta\gamma$  y (R,R)-M554 calculando la energía libre de unión por el método MM-GBSA en los primeros 20 ns se obtuvo  $-18,7\pm 4$  kcal/mol y la molécula se ubica al final de la simulación en el poro de  $G\beta\gamma$  este cambio en la ubicación debido a su flexibilidad y naturaleza quiral hace que la molécula adopte una conformación diferente a las definida en el docking molecular con Autodock Vina 4 (Trott & Olson, 2010). Por lo tanto, se decide extender la dinámica en 50 ns extras obteniendo 70 ns en total resultando en los cálculos de energía MM-GBSA un valor de  $-19,5\pm 4$  Kcal/mol (Tabla 5).

Es relevante mencionar que debido a la complejidad de los tiempos de cómputo se decide realizar un primer screening de los ligandos seleccionando aquellos que se mantuvieron estables en el sitio de interés de la proteína  $G\beta\gamma$  en los primeros 20 ns de simulación y la segunda selección al final de los 70 ns estudiando interacciones no covalentes y analizando los gráficos de RMSD.

Dentro del análisis bioinformático, se seleccionaron a partir del grupo en forma decreciente las moléculas (R)-2T\_175, (S)-2T\_175, (R,S)-4M554\_2 y finalmente (R)-2T\_181 debido a que presentaron menor energía libre de asociación a la proteína  $G\beta\gamma$  y se mantuvieron interaccionando en un sitio similar a (R,R)-M554, como se detallará más adelante.



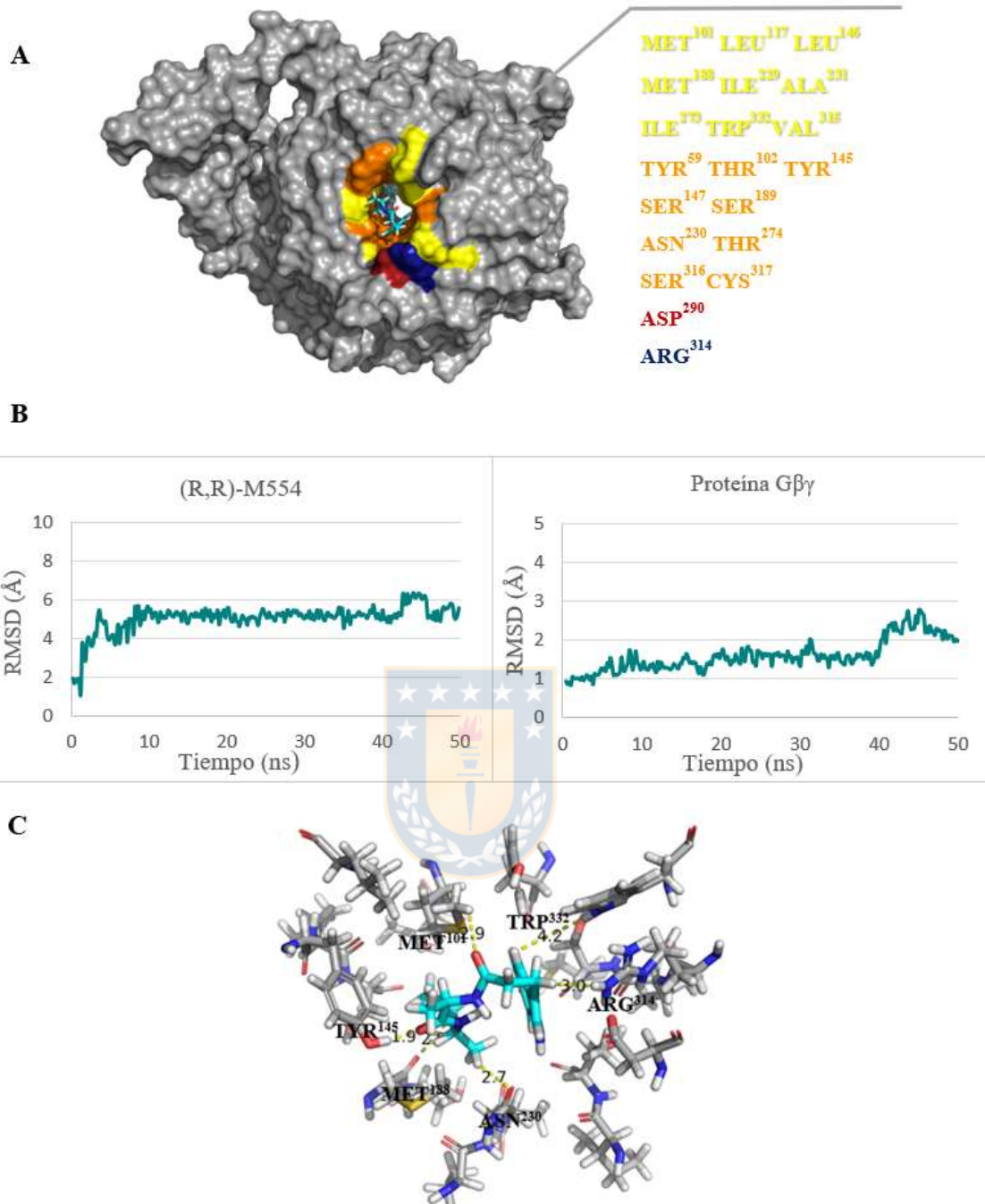
**Tabla 5: Energías de interacción por el método MM-GBSA y RMSD a 20 ns y 70 ns de los análogos de M554 y de M890.** En la tabla se detallan las energías libres de asociación (kcal/mol) y el promedio del RMSD (Å) calculado respecto a la distancia de la estructura promedio junto a la desviación estándar evaluando los cambios bioisostéricos y de Gβγ. Se destacó en celeste las moléculas seleccionadas para este estudio.

<b>Moléculas</b>	<b>MM-GBSA (kcal/mol) 20 ns</b>	<b>RMSD (Å) Gβγ</b>	<b>RSMD (Å) Ligando</b>	<b>MM-GBSA (kcal/mol) 70 ns</b>	<b>RMSD (Å) Gβγ</b>	<b>RMSD (Å) Ligando</b>
<b>(R,R)-M554</b>	-18,7±4	1,5±0,1	5,6±1,3	-19,5± 4	1,6±0,4	5±0,7
<b>3M554_3</b>	-11±6	1,9±0,2	6,9±1,3	-11±6	2,5±0,2	6,1±2,4
<b>(R,S)-3M554_4</b>	-26±5	1,8±0,1	5,1±0,7	-4±5	1,4±0,1	27±19
<b>(R,S)-4M554_2</b>	-17±5	1,5±0,2	9,8±3,3	-20±5	1,9±0,1	4,8±0,8
<b>4M554_3</b>	-11±5	1,6±0,2	2,9±1	-15±4,5	1,6±0,4	6,4±2,2
<b>7M554_1</b>	-14±6	1,4±0,2	5,5±6,8	-	-	-
<b>(R)-3M890_5</b>	-1±3	2±0,3	41±18	-	-	-
<b>(S)-3M890_5</b>	-13±7	1,6±0,2	17±4	-22±7	1,3±0,1	10±2
<b>2T_173</b>	-18±2,4	1,5±0,3	4,4±1	-12±8,2	2±0,2	15±14
<b>2T_180</b>	-13±4,6	1,7±0,3	22±7	-19±5,5	2,2±0,2	8±0,4
<b>(R)-2T_181</b>	-13±5,5	1,2±0,1	12±7	-20±3,9	1,7±0,1	12±6
<b>(S)- 2T_181</b>	-9±5	1,4±0,1	14±6	-15±7,8	1,3±0,2	26±4
<b>2T_185</b>	-12±5,6	1,8±0,3	14±13	-	-	-
<b>2T_186</b>	-4±4,7	1,6±0,7	26±22	-	-	-
<b>(R)- 2T_178</b>	-13±5,4	2±0,3	7±1,5	-	-	-
<b>(S)- 2T_178</b>	-18±8,2	1,5±0,2	14±3	-19±5,1	1,2±0,1	3,6±2
<b>2T_174</b>	-12±5	1,5±0,2	8,6±3	-18±3,5	1,7±0,1	3,5±1,6
<b>(R)-2T_175</b>	-19±11,1	1,6±0,1	10±3	-22±3,1	1,9±0,1	3,6±0,7
<b>(S)-2T_175</b>	-19±3,5	1,5±0,1	6,1±0,8	-21±6,7	1,6±0,1	6,4±3
<b>(R)-2T_182b</b>	-9±4,2	1,7±0,2	16±7	-15±4,8	2±0,1	14±4
<b>(S)-2T_182b</b>	-16±4,8	1,3±0,1	5,5±1	-16±3,6	1,2±0,1	3,6±1

De este modo, se obtuvo como resultado al final de la simulación de 70 que la molécula (R,R)-M554 se mantuvo estable en un *core* compuesto principalmente por aminoácidos hidrofóbicos y polares (sin carga) ubicados en el poro de Gβγ durante los últimos 50 ns de simulación, como se observó en la figura 19 (A).

En los estudios de energía por MM-GBSA se utilizaron los 250 *frames* almacenados en la DM obteniendo un valor de  $-19,5 \pm 4$  kcal/mol (tabla 5 para 70 ns). Las gráficas expresadas en la figura 19 (B), muestran el desplazamiento de los átomos que componen la proteína con un valor de RMSD de  $1,6 \pm 0,4$  Å siendo menor a 2 Å, lo que demostró estabilidad en el sitio de asociación. El RMSD de la molécula (R,R)-M554 presentó un mayor desplazamiento que la proteína con un valor promedio de  $5 \pm 0,7$  Å de distancia calculada con respecto a la distancia de la estructura promedio manteniéndose estable sobre Gβγ, además esta distancia le permitió establecer interacciones no covalentes (Gallivan & Dougherty, 1999).

Dentro del análisis, se estudiaron las distancias interatómicas entre los residuos involucrados en la asociación de (R,R)-M554 (Figura 19 (C)). Entre las más relevantes destacaron la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del residuo TYR145 y el carbonilo de la molécula con una distancia media de 3,3 Å que permanece el 61,2% del tiempo asociado en los últimos 50 ns de simulación con un ángulo promedio de 133°. Entre otras interacciones intermoleculares se encontraron las fuerzas de Van der Waals como la fuerza ión-dipolo inducido con el grupo guanidino de ARG314 con un 81,6% de permanencia y a una distancia de 3,9 Å. Las fuerzas de tipo dipolo-dipolo inducido entre grupos metilos presentes en (R,R)-M554 con los residuos próximos como el grupo carbonilo de ASN230 a una distancia promedio de 4,6 Å y con un 74% de permanencia, grupo carbonilo de MET188 a 4,9 Å con un 73% de ocurrencia, de igual modo, el grupo carbonilo de la molécula establece una interacción dipolo-dipolo inducido entre el grupo metilo de MET101 a una distancia media de 5,1 Å y un 51% de ocurrencia. Finalmente, el solapamiento de los anillos aromáticos generó interacciones de tipo stacking  $\pi$ - $\pi$  entre los grupos indol de TRP332 y la molécula ocurriendo un 59% a una distancia media de 5,5 Å.



**Figura 19: Análisis de dinámica de interacción de la molécula (R,R)-M554 en la proteína Gβγ.** A) Zona de interacción en la proteína al final de los 70 ns totales y los aminoácidos próximos a 5 Å de (R,R)-M554 destacándose en rojo los aminoácidos con carga negativa, en azul los que tienen carga positiva, no polares en amarillo y en naranja polares (sin carga). B) Representación gráfica del RMSD para la proteína y para la molécula en los últimos 50 ns. C) Representación de los aminoácidos de Gβγ a 5 Å y se mencionan aquellos que establecen algún tipo de interacción no covalente.

## Caracterización del sitio de asociación de las nuevas moléculas análogas a M554 y M890

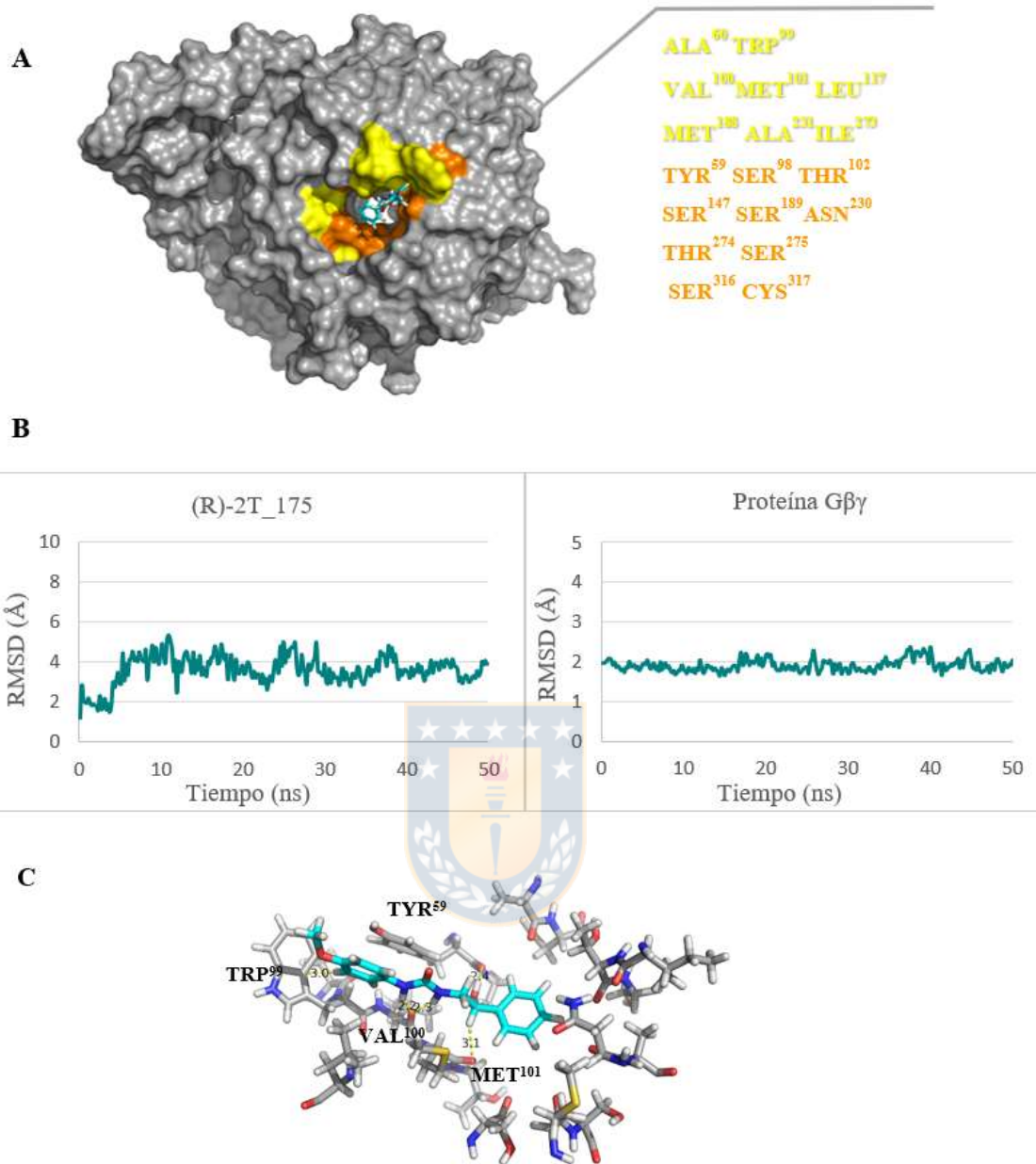
El grupo de moléculas seleccionadas mediante DM con Amber a 70 ns totales, permitió identificar ligandos que poseen menor energía libre de unión al dímero G $\beta$  mediante estudios de MM-GBSA. La región de asociación corresponde a la misma zona de unión de la molécula (R,R)-M554, que además, corresponde al *hotspot* de la proteína en estudio.

A las moléculas obtenidas introduciendo sustituciones bioisostéricas en M554 se les realizó una primera etapa de selección y simulación de 20 ns donde se obtuvieron 15 moléculas que se mantuvieron estables y asociadas a la proteína. Luego estos sistemas son extendidos en 50 ns hasta obtener los 70 ns totales. De tal forma, se pasa a una nueva etapa de selección determinándose los cuatro ligandos con mejores resultados durante la DM de 70 ns. El resto de las moléculas con sustituciones isostéricas no resultaron favorecidas ya que no se estabilizaron en la región de estudio, asociándose a una zona diferente al *hotspot* y en la mayoría de los casos con una energía de asociación muy alta.

La primera molécula seleccionada corresponde a (R)-2T\_175 con una energía libre de  $-22\pm 3,1$  Kcal/mol (tabla 5) que se mantuvo en un *core* compuesto en su totalidad por aminoácidos hidrofóbicos y polares sin carga como se observa en la figura 20 (A).

El análisis de RMSD para la proteína generó un valor promedio de  $1,9\pm 0,1$  Å y para la molécula de  $3,6\pm 0,7$  Å (Figura 21(B)) distancia idónea que permitió la estabilidad de la interacción.

La interacción más relevante corresponde a un puente de hidrogeno producido entre el grupo carbonilo de VAL100 y el NH del ligando con una distancia promedio de  $2,4$  Å, con un ángulo medio de  $145^\circ$  con una ocurrencia del 63% del tiempo durante los últimos 50 ns de DM. Entre otras interacciones encontramos las de tipo no covalente como las fuerzas dipolo-dipolo entre el carbonilo de TYR59 y el hidroxilo del ligando a una distancia media de  $3,2$  Å con un 80% de permanencia. Las siguientes interacciones correspondieron a las de tipo dipolo-dipolo inducido por el grupo carbonilo de MET101 y los grupos metilo de la molécula con una proximidad de  $3,8$  Å y un 85% de ocurrencia. Finalmente, los anillos aromáticos establecieron interacciones de tipo stacking  $\pi$ - $\pi$  de TRP99 y el grupo metoxibenceno a  $4$  Å con un 82% de permanencia (Figura 20 (C)).



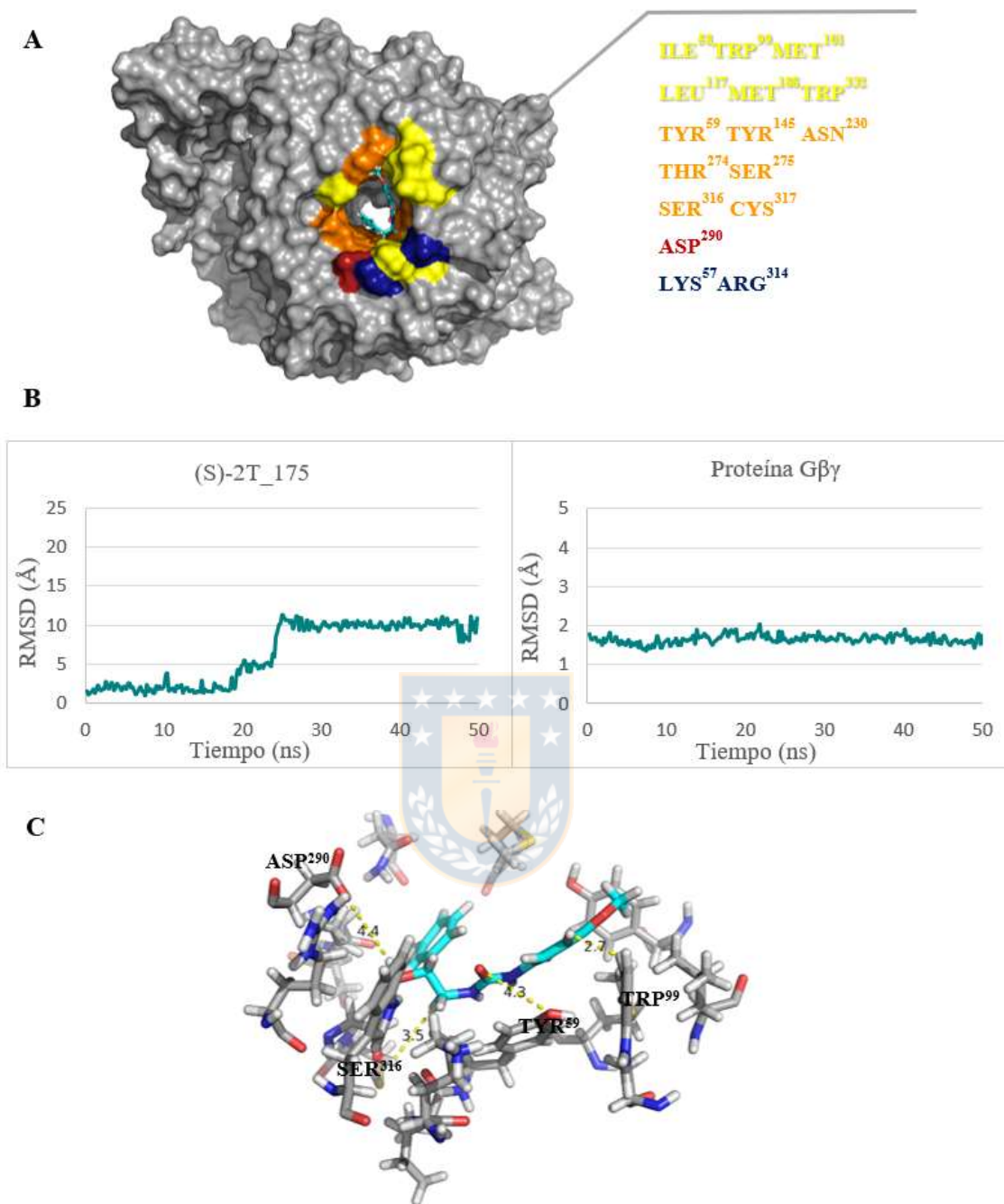
**Figura 20: Análisis de dinámica de interacción de la molécula (R)-2T\_175 en la proteína Gβγ.**  
 A) Zona de interacción en la proteína al final de los 70 ns totales y los aminoácidos próximos a 5 Å de (R)-2T\_175 no polares en amarillo y en naranja polares (sin carga). B) Representación gráfica del RMSD para la proteína y para la molécula en los últimos 50 ns. C) Representación de los aminoácidos de Gβγ a 5 Å y se mencionaron aquellos que establecen algún tipo de interacción no covalente.

La segunda molécula más favorecida correspondió a (S)-2T\_175 que es el enantiómero de la molécula (R)-2T\_175. De acuerdo a los estudios de MM-GBSA la molécula (S)-2T\_175 interaccionó con la proteína Gβγ con una energía de  $-21 \pm 6,7$  Kcal/mol y se ubicó en la proteína en un sitio compuesto mayoritariamente por residuos polares (sin carga) e hidrofóbicos que incluye a ASP290, LYS57 y ARG314 (Figura 21 (A)).

La variación en la estructura de Gβγ quedó reflejado a través del RMSD con un valor promedio de  $1,6 \pm 0,1$  Å. Para el ligando el RMSD promedio es de  $6,4 \pm 3$  Å como se observó en el gráfico presente en la figura 21 (B), donde se apreciaron dos segmentos del gráfico. Por un lado, se observó la conformación donde el ligando se encontró ubicado alrededor del poro de la proteína (valor del gráfico de 3 Å) y la otra conformación que adquiere es dentro del *hotspot* (alrededor de 10 Å en el gráfico), por lo tanto, se decidió seleccionar la conformación que presentó menor movimiento sobre la proteína Gβγ que corresponde a la primera conformación del gráfico a los 17 ns.

Las interacciones que permitieron la asociación proteína-ligando están dadas por las fuerzas de Van der Waals de tipo dipolo-dipolo como la que ocurrió entre el hidroxilo de TYR59 y el N del ligando con una distancia media de 3,6 Å con una permanencia del 72%. La segunda interacción de este tipo ocurrió entre el carbonilo de ASP290 y el hidroxilo de la molécula a una distancia media de 3,6 Å y una permanencia del 73%. Las siguientes interacciones más débiles dipolo-dipolo inducido se dieron entre el hidroxilo de SER316 y el grupo metilo de la molécula. Por último, ocurrió la asociación entre los anillos aromáticos de tipo *stacking*  $\pi$ - $\pi$  entre el indol del TRP99 y el metoxibenceno del ligando (Figura 21(C)).





**Figura 21: Análisis de dinámica de interacción de la molécula (S)-2T\_175 en la proteína Gβγ.**

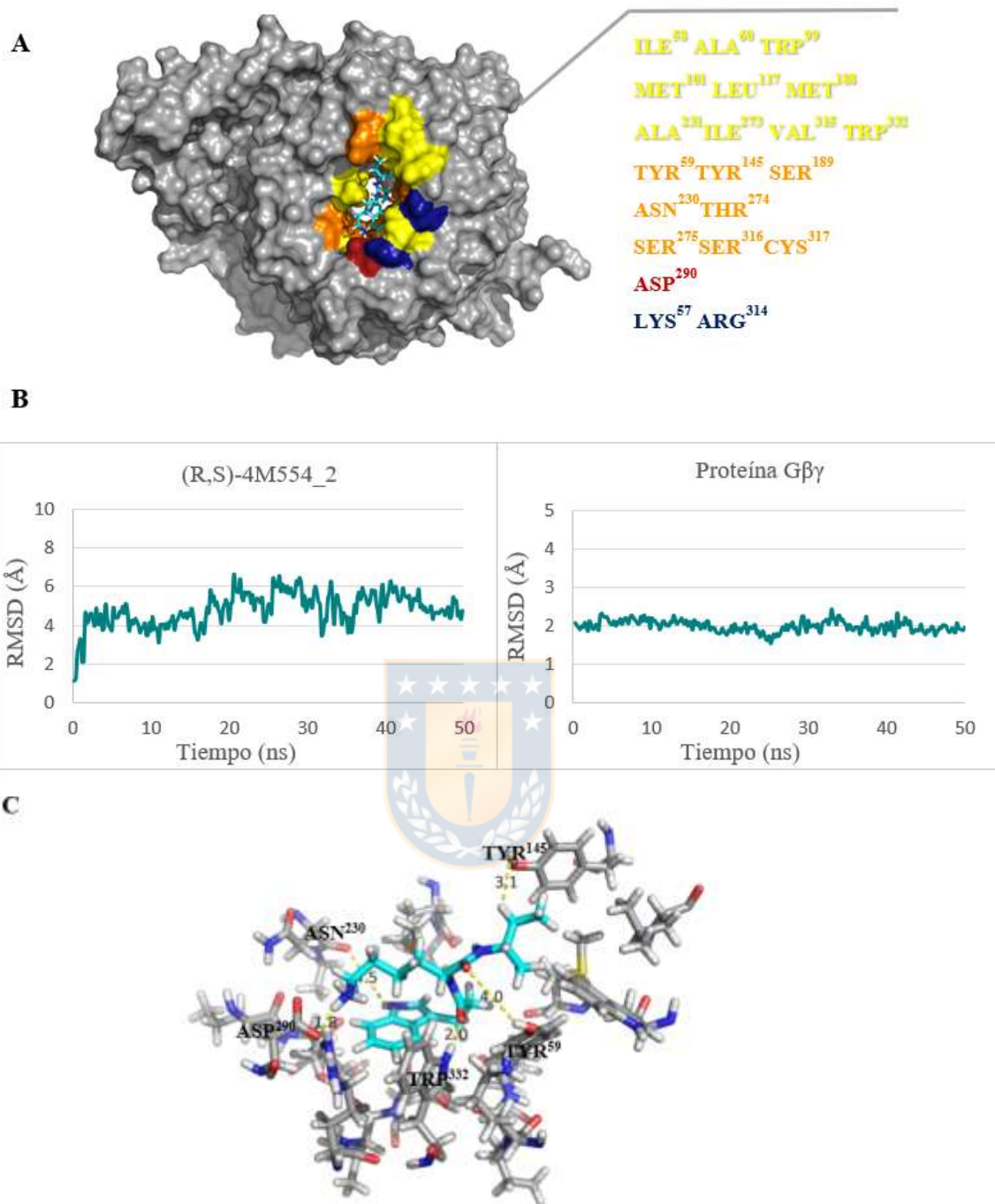
A) Zona de interacción en la proteína al final de los 17 ns totales y los aminoácidos próximos a 5 Å de (S)-2T\_175 destacándose en rojo los aminoácidos con carga negativa, en azul los que tienen carga positiva, no polares en amarillo y en naranja polares (sin carga). B) Representación gráfica del RMSD para la proteína y para la molécula en los últimos 50 ns. C) Representación de los aminoácidos de Gβγ a 5 Å y se rotularon aquellos que establecen algún tipo de interacción no covalente.

La siguiente molécula es (R,S)-4M554\_2 con una energía de asociación de  $-20\pm 5$  Kcal/mol en una región de  $G\beta\gamma$  en un *core* compuesto mayoritariamente por residuos hidrofóbicos y polares (sin carga) como se observaron en la figura 22 (A) que incluyeron residuos como ASP290, LYS57 y ARG314.

La extensión de los movimientos de la molécula se ve reflejado en el gráfico de la figura 22 (B) con el RMSD tanto de la proteína como del ligando con un valor de  $1,9\pm 0,1$  Å y de  $4,8\pm 0,8$  Å, respectivamente.

Las interacciones que prevalecieron dentro de la asociación son las fuerzas de Van der Waals del tipo dipolo-dipolo entre ellas la más relevante es aquella que ocurrieron entre el hidroxilo de TYR59 y el grupo carbonilo de la molécula a una distancia de 4,5 Å con un 67% de ocurrencia; la siguiente interacción de este tipo ocurre entre el carbonilo de ASN230 y el N del grupo indol de la molécula (R,S)-4M554\_2 con una distancia de 5 Å y con una permanencia del 40%; Además, entre el grupo carbonilo de ASP290 y grupo amino del ligando se generó otra interacción de este tipo con una distancia media de 6 Å y con un 38% de permanencia durante la simulación. Finalmente, el grupo del TRP332 y el carbonilo de la molécula lograron establecer a una distancia media de 5,3 Å y con un 33% de permanencia una interacción dipolo-dipolo. Finalmente, las interacciones débiles dipolo-dipolo inducido entre el hidroxilo TYR145 y el ligando a una distancia promedio de 5 Å y con un 35% de permanencia. Estas interacciones se vieron representadas en la figura 22 (C).



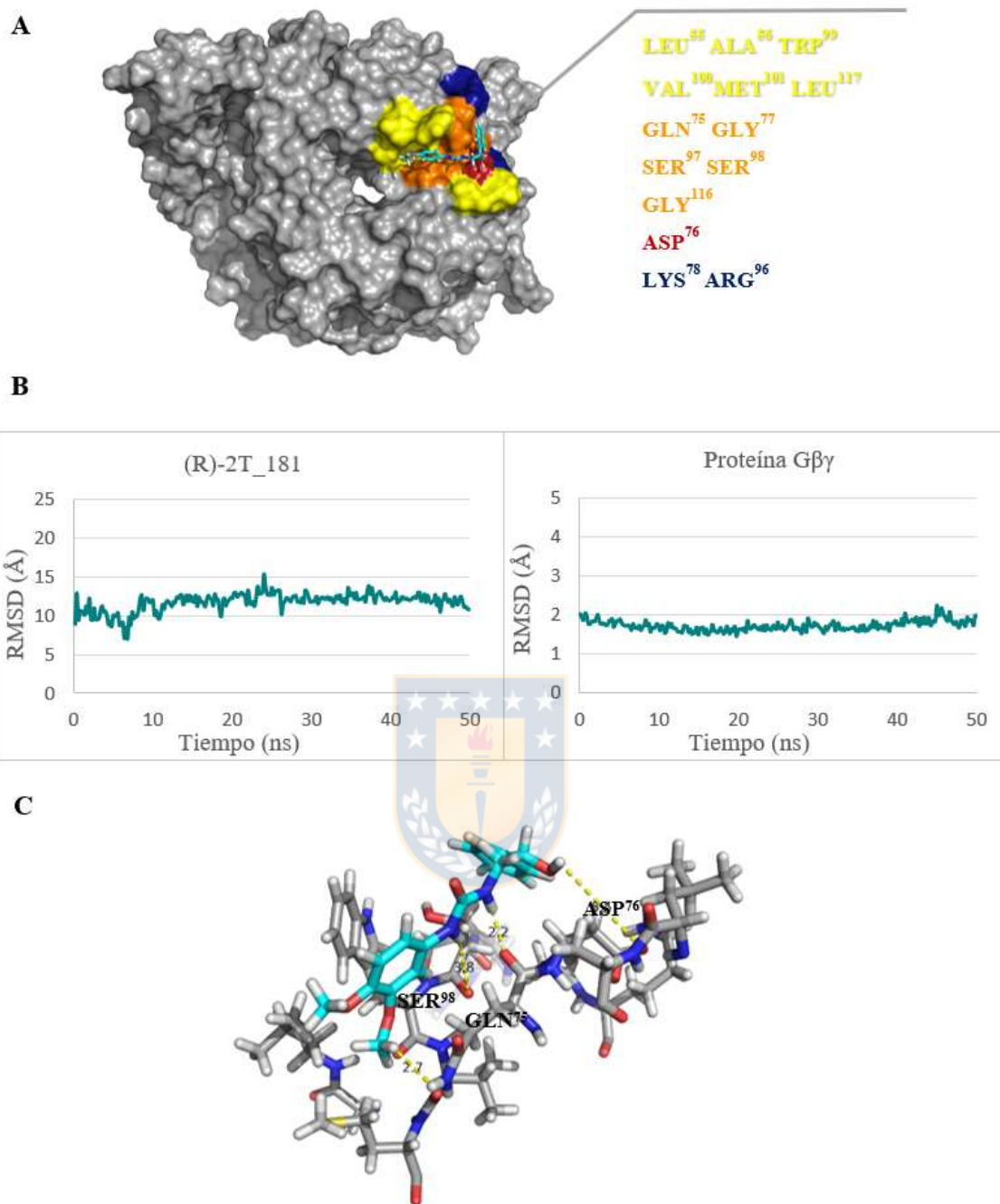


**Figura 22: Análisis de dinámica de interacción de la molécula (R,S)-4M554\_2 en la proteína Gβγ.** A) Zona de interacción en la proteína al final de los 70 ns totales y los aminoácidos próximos a 5 Å de (R,S)-4M554\_2 destacándose en rojo los aminoácidos con carga negativa, en azul los que tienen carga positiva, no polares en amarillo y en naranja polares (sin carga). B) Representación gráfica del RMSD para la proteína y para la molécula en los últimos 50 ns. C) Representación de los aminoácidos de Gβγ a 5 Å y se mencionaron aquellos que establecen algún tipo de interacción no covalente.

Para concluir, la última molécula que fue seleccionada del grupo corresponde a (R)-2T\_181 este ligando posee un enantiómero correspondiente a la molécula (S)-2T\_181, pero esta molécula se une a una región diferente al *hotspot* de la proteína Gβγ y esta asociación requirió de una energía mayor, por este motivo es muy probable que este enantiómero sea inactivo en el efecto inhibitor de la proteína. Sin embargo, es relevante mencionar que la molécula 2T\_181 fue utilizada más adelante en ensayos de viabilidad celular, pero no se presentó en forma pura (mezcla racémica).

La molécula (R)-2T\_181 presentó en los estudios de MM-GBSA una energía de unión de  $-20 \pm 3,9$  Kcal/mol ubicándose en una región de Gβγ compuesto por residuos no polares y polares (sin carga) que, además, incluyendo residuos cargados negativamente como ASP290 y los aminoácidos positivos como LYS57 y ARG314 como se ve reflejado en la figura 23 (A). Los RMSD obtenidos en los últimos 50 ns de simulación arrojaron un valor promedio de  $1,7 \pm 0,1$  Å para la proteína y para el ligando de  $12 \pm 6$  Å distancia media que permitió establecer las interacciones no covalentes (Figura 23 (B)).

Entre las interacciones que permitieron la asociación de (R)-2T\_181 a Gβγ está el puente de hidrogeno entre un carbonilo de GLN75 y el NH presente en la molécula a una distancia promedio de  $3,4$  Å con un ángulo de enlace de  $140^\circ$  entre el dador y aceptor de electrones que permanece formado 45% durante el tiempo de la DM en los últimos 50 ns. Las siguientes interacciones son del tipo Van der Waals como las de tipo dipolo-dipolo que ocurren entre el grupo carbonilo de SER98 y el NH del ligando a  $4,3$  Å con una permanencia de un 88%. Con una menor fuerza encontramos la interacción dipolo-dipolo entre ASP76 con el hidroxilo del ligando a una distancia media  $7$  Å con un 20% de ocurrencia. Finalmente, la última interacción débil es del tipo dipolo-dipolo inducido entre GLN75 y los grupos metilo del ligando con una distancia media de  $5,5$  Å con un 66% de permanencia (Figura 23 (C)).



**Figura 23: Análisis de dinámica de interacción de la molécula (R)-2T\_181 en la proteína Gβγ.**  
 A) Zona de interacción en la proteína al final de los 70 ns totales y los aminoácidos próximos a 5 Å de (R)-2T\_181 destacándose en rojo los aminoácidos con carga negativa, en azul los que tienen carga positiva, no polares en amarillo y en naranja polares (sin carga). B) Representación gráfica del RMSD para la proteína y para la molécula en los últimos 50 ns. C) Representación de los aminoácidos de Gβγ a 5 Å y se mencionaron aquellos que establecen algún tipo de interacción no covalente.

## Viabilidad celular con moléculas análogas a M554 y M890

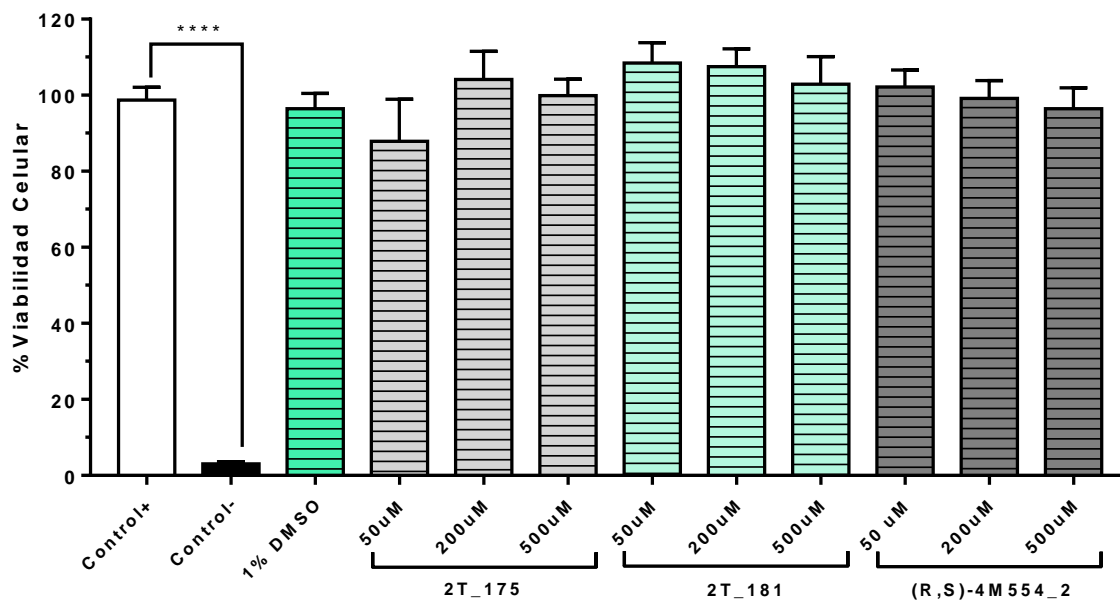
Con el propósito de conocer si las nuevas moléculas análogas a M554 y M890 son tóxicas se realizaron ensayos de viabilidad celular en la línea celular HEK-293 considerando un tiempo de exposición de 24 horas, para ello se utilizó un método espectrofotométrico utilizando el reactivo Alamar Blue™.

Dentro del análisis de viabilidad celular se probaron las moléculas a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  y a 500  $\mu\text{M}$  de igual forma se estimó el efecto de la concentración de DMSO al 1%. Debido a que este compuesto ha presentado toxicidad a bajas concentraciones induciendo apoptosis en ratas (2%, 4% y 8% en v/v) (Galvao *et al.*, 2014).

Este estudio involucro las moléculas (R)-2T\_175 y (S)-2T\_175 que son enantiómeros y mediante estudios bioinformáticos son más favorecidas, coincidentemente no se encuentra en su estereoquímica pura, por el contrario, se presentó como mezcla racémica y de esta manera fue utilizada en ensayos *in vitro* de viabilidad celular. Por el contrario, la molécula (R)-2T\_181 correspondió al enantiómero mejor evaluado con respecto a (S)-2T\_181, pero este compuesto no se encuentra en su forma aislada. Mientras tanto, la molécula (R,S)-4M554\_2 se encontró el compuesto purificado.

Como resultado, se obtiene que las moléculas no presentaron un efecto citotóxico significativo en las células HEK-293 expuestas por 24 horas a los nuevos ligandos 2T\_175, 2T\_181 y (R,S)-4M554\_2 a concentraciones crecientes. Los datos de fluorescencia son normalizados con respecto al control positivo de viabilidad celular (Control +). En el caso del solvente al 1% no se apreciaron diferencias significativas con respecto al control de muerte celular (Control -). Este efecto se pudo apreciar en la gráfica presentada en la figura 24.

Las moléculas análogas que lograron solubilizarse en este estudio fueron solamente 2T\_175, 2T\_181 y (R,S)-4M554\_2. Por otro lado, es relevante añadir que las moléculas (S)-3M890\_5, 2T\_180 y (S)-2T\_178 presentaron buenos resultados en los estudios bioinformáticos, pero al intentar solubilizarlas en las condiciones empleadas en este estudio no fueron solubles.



**Figura 24: Análisis de viabilidad celular frente a la incubación con las moléculas que se indican.**

La gráfica mostró los niveles porcentaje de viabilidad en HEK-293 detectados frente a la incubación con las moléculas 2T\_175, 2T\_181 y (R,S)-4M554\_2 a concentraciones de 50  $\mu$ M, 200  $\mu$ M y 500  $\mu$ M por 24 horas. Los valores representaron el promedio  $\pm$  desviación estándar (*One-Way ANOVA* test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

El etanol se encuentra en una variedad de bebidas alcohólicas y su consumo se puede dar de forma ocasional (aguda) o crónica (alcoholismo). Los efectos agudos sobre el sistema nervioso incluyen al inicio, una fase de estimulación. Conforme aumenta la dosis se transforma en depresión de la actividad neuronal (Mora, 2016). Debido a la fácil adquisición y al alto consumo, resulta importante conocer su mecanismo de acción con el fin de revertir los efectos que induce el consumo de etanol en altas dosis. Actualmente, se conoce que entre los blancos moleculares del etanol se encuentran los canales iónicos activados por ligando (Deitrich *et al.*, 1989; Aguayo *et al.*, 1990; Hogg *et al.*, 2005; Molander *et al.*, 2007). El GlyR es un canal iónico inhibitorio que puede ser modulado por etanol (Aguayo & Pancetti, 1994) mediante un mecanismo intracelular que depende del dímero G $\beta\gamma$  (Yévenes *et al.*, 2003; 2006; 2008). Esta interacción se basa en residuos específicos permiten la interacción entre el dominio citoplasmático del GlyR y G $\beta\gamma$  basándose en esta región se han identificado inhibidores como las moléculas pequeñas M554 y M890 para interferir en la asociación y revertir parcialmente los efectos del etanol (Fabian Cerda, Tesis Bioingeniería, 2012; San Martín, 2016).

Estos datos, han proporcionado la base para continuar con la búsqueda de una molécula pequeña capaz de interferir sobre el *hotspot* del dímero G $\beta\gamma$  para inhibir la potenciación de GlyR en presencia de altas concentraciones de etanol. Conociendo esta información, en este trabajo de tesis se ha dividido en dos partes: la primera referido al estudio de moléculas derivadas de M554 y M890, y la segunda en donde se aborda el diseño de nuevas moléculas mediante sustituciones bioisostéricas en M890 y M554 que luego son seleccionadas por estudios de energía de asociación.

### **Búsqueda de inhibidores del dímero G $\beta\gamma$ proteína clave en la activación del GlyR en la intoxicación aguda por etanol.**

Una de las fases más tempranas del desarrollo de nuevos fármacos inicia con la identificación de ligandos que se unen mejor a un objetivo, como una proteína o enzima en particular. Realizar ensayos tradicionales para identificar prospectos de moléculas, es un trabajo arduo y costoso, proceso que puede ser realizado por medio de simulaciones por las computadoras a costos mucho menores. La Bioinformática permite estudiar las interacciones

bioquímicas a un ritmo y volumen que supera a los métodos tradicionales *in vitro* o *in vivo*. Tales avances tecnológicos han hecho que las técnicas *in silico* sean cada vez más efectivas en la fase de descubrimiento de fármacos, que pueden filtrar millones de moléculas a una velocidad rentable que de otro modo no estaría disponible (Carlson & McCammon, 2000; Mandal *et al.*, 2009; Jordan, 2020).

Para este procedimiento típicamente, las estructuras cristalizadas utilizadas son consideradas aceptables cuando las resoluciones se extienden a más de 2,5 Å para el diseño de medicamentos, ya que tienen una alta relación de datos a parámetros y la colocación de residuos en el mapa de densidad de electrones no es ambigua (Anderson, 2003). Considerando esta información, en muchos casos se utiliza como estrategias para el diseño de nuevos fármacos la sustitución bioisósterica buscando optimizar otros parámetros, como la potencia farmacológica, solubilidad y mitigar las posibles respuestas metabólicas (Bonandi *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2012).

### **Moléculas pequeñas interfieren en los incrementos transitorios de Ca<sup>2+</sup> en neuronas espinales de 8-10 días de cultivo**

Con el propósito de estudiar si las moléculas M809\_4 y M809\_5 interfieren en la actividad sináptica se estudiaron las transitorias de Ca<sup>2+</sup> en neuronas espinales. Los resultados de la medición de transitorias de Ca<sup>2+</sup> en neuronas espinales de ratón nos evidencian una disminución de la frecuencia de *peaks* durante 200 s inducida por etanol en un 22%±4% (100 mM) en comparación con la condición control. De esta forma, los resultados indican que la aplicación aguda de etanol produjo reducción en la frecuencia de las transitorias. El etanol tiene efectos profundos sobre la actividad de neuronas prefrontales y sugieren que esta acción puede ser la base del deterioro cognitivo asociado con la intoxicación aguda por alcohol (Woodward & Pava, 2012).

Estos resultados son coincidentes con datos previos que indican que el etanol tiene la capacidad de alterar reduciendo significativamente la frecuencia de transitorios espontáneos de Ca<sup>2+</sup> en somas de células granulares de una manera dependiente de la dosis. Por ejemplo, el número medio de transitorios espontáneos de Ca<sup>2+</sup> en las células granulares se redujo a 88% (25 mM de etanol), 73% (50 mM de etanol), 48% (100 mM de etanol) y 35% (200 mM de etanol) del control después de la administración de etanol. Estos resultados sugieren que



uno de los mecanismos celulares que subyacen a la acción del etanol sobre la migración neuronal es precisamente la alteración de la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  (Kumada *et al.*, 2006; Abrahao *et al.*, 2017).

Al tratar las neuronas con la molécula M809\_5 (200  $\mu\text{M}$ ) se obtuvo una reducción de un  $56\% \pm 4\%$  resultado que se ve potenciado al adicionar etanol obteniendo una disminución de un  $67\% \pm 2\%$  en las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, la molécula M809\_5 induce alteraciones en las neuronas espinales de ratón induciendo una marcada disminución en la frecuencia de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$ . El efecto de M809\_4 (200  $\mu\text{M}$ ) sobre una red de neuronas de cultivo primario parece indicar que esta molécula no genera alteraciones sobre las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que no altero la frecuencia por si sola ni al añadir etanol (Figura 7 y 8), ofreciendo una respuesta muy similar a las neuronas espinales analizadas en el control.

Estos resultados indicaron que M809\_4 inhibe los efectos del etanol sobre actividad sináptica medida como incrementos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y estimula la actividad de la red neuronal espontánea. Nuevos experimentos debieran determinar si este aumento se produce por el número de sinapsis activas o la funcionalidad de red neuronal.

### **Las moléculas M809\_4 y M809\_5 favorecen la recuperación de la coordinación motora en ratones intoxicados con etanol de forma aguda.**

Las neuronas glicinérgicas se encuentran en numerosas zonas del sistema nervioso central, aunque son especialmente abundantes en el tronco encefálico y la médula espinal, principalmente. Las interneuronas glicinérgicas inhibitorias controlan la generación de ritmos motores, la coordinación de respuestas reflejas espinales y el procesamiento de señales sensoriales y nociceptivas (Lynch, 2004). Las interneuronas espinales glicinérgicas median circuitos reflejos de inhibición recíproca, permitiendo de esta forma la relajación de músculos antagonicos y la contracción coordinada de músculos agonistas, mientras que las interneuronas de Renshaw regulan la excitabilidad de las motoneuronas mediante la producción de señales inhibitorias recurrentes a través de un sistema de retroalimentación negativa (Zafra *et al.*, 1997; Legendre, 2001).

Existe evidencia que fundamenta la modulación del etanol sobre el GlyR, principal receptor inhibitorio en neuronas glicinérgicas, produciendo la potenciación del GlyR involucrado en



muchos de los síntomas característicos de la intoxicación etílica aguda. Los efectos del etanol sobre el comportamiento han demostrado la implicancia del GlyR (Blednov *et al.*, 2015).

Entre los métodos para estudiar la coordinación motora en murinos destaca la prueba de la barra giratoria, en la que el animal se coloca sobre una barra horizontal que gira alrededor de su eje longitudinal; el animal debe caminar hacia adelante para mantenerse erguido y no caerse (Shiotsuki *et al.*, 2010; Diacono, 2013). Basado en estas evidencias, se determinó el efecto de las moléculas M809\_4 y M809\_5 (100 mg/kg i.p.) en ratones a los cuales se les había inyectado una dosis de etanol de (2,0 g/kg i.p.). Los animales que recibieron estas moléculas tuvieron una recuperación más rápida de la incoordinación motora causada por etanol en presencia de la molécula M809\_4 o M809\_5 desde los 15 minutos después de la inyección para el caso de los animales que poseen etanol se produce una elevada incoordinación motora lo que se ve reflejada en un valor de  $28\pm 4\%$ , no obstante, en los animales tratados con la molécula M809\_4/EtOH este valor se registró en  $63\pm 6\%$ , similar a la molécula M809\_5/EtOH con un porcentaje de  $76\pm 5\%$  obteniendo un mayor desempeño motor en los animales y una menor disposición a caer de la rueda giratoria, esta recuperación va en aumento en los registros realizados en el tiempo.

Estos resultados están de acuerdo con resultados previos realizados *in silico* en que tanto M809\_4 y M809\_5 presentan una menor energía libre de unión al dímero G $\beta$  $\gamma$  con respecto a la molécula (R,R)-M554. Resultados previamente publicados indican que la mezcla racémica de M554 a los 15 minutos no se observan mejoras en la coordinación motora, pero si se ve reflejado el efecto de M554 a los 75 minutos luego de las inyecciones (San Martín *et al.*, 2016). Al trabajar con el diastereoisómero (R,R)-M554 en este tipo de experimentos se alcanzó casi el mismo efecto inhibitorio de la potenciación del etanol GlyR que la mezcla racémica de la molécula. La molécula (S,R)-M554 presentó un comportamiento similar a (R,R)-M554. En este punto, una conclusión obvia es que la configuración R del segundo carbono quiral es importante en la inhibición sobre la potenciación del etanol, y probablemente permite una mejor interacción con el sitio de unión en la estructura de G $\beta$  $\gamma$  (Vásquez *et al.*, 2020).

Al contrario, de los resultados obtenidos en los registros de las transitorias de Ca<sup>2+</sup> con respecto a los resultados del ensayo de rotarod acelerado se obtiene disparidad en el efecto de las moléculas, esto podría deberse principalmente a que las moléculas M809\_4 y M809\_5

fueron diseñadas siguiendo un modelo que involucra la subunidad  $\alpha 1$ -GlyR que se encuentra presente en la medula espinal de ratones adultos, mientras que las neuronas espinales utilizadas entre los días 8-10 de cultivo poseen la isoforma  $\alpha 2$ -GlyR. Se ha demostrado que La isoforma  $\alpha 2$  se expresa en altas concentraciones durante el desarrollo embrionario y disminuye en la etapa postnatal, manteniendo una baja expresión en el adulto (Racca *et al.*, 1998). Se considera que los GlyR embrionarios y postnatales formados por esta isoforma son homoméricos y extrasinápticos. A su vez, el ARNm que codifica para la isoforma  $\alpha 1$  se expresa en pequeñas cantidades en el embrión y en los primeros días de la rata, pero aumenta a medida que avanza el desarrollo, llegando a un máximo en el día 15. La subunidad  $\alpha 3$  se encuentra en bajas concentraciones en médula espinal (Anderson *et al.*, 2009) y tronco encefálico (Manzke *et al.*, 2010) del animal adulto.

### **Modificaciones bioisostéricas**

Las moléculas guías fueron M554 y M890 prestando principal atención a la quiralidad, ya que los aminoácidos, y por lo tanto las proteínas, carbohidratos, hormonas y alcaloides, son en general compuestos quirales (Mislow, 1999). Los procesos fisiológicos esenciales transcurren con total estereoselectividad, es decir, que los sistemas biológicos son capaces de reconocer y discriminar entre determinados estereoisómeros y desencadenar diferentes respuestas (Bonner, 2000).

Entre los cambios realizados en M554 están las sustituciones de H por moléculas como  $\text{NH}_2$ , OH, fenilo, metilo obteniendo un grupo de cinco moléculas que son estudiadas por técnicas bioinformáticas (Brown *et al.*, 2012). Resultando uno de los cambios, favorecidos bajos los criterios de selección para las moléculas (R,S)-4M554\_2, cuya estructura se diferencia de M554 por la adición de un grupo butanamina en uno de los centros quirales. En el caso de las moléculas análogas a M890 se agregan algunos grupos que forman parte de la molécula M809a como la sustitución del grupo furano-3-il(piperidina-1-il)metanona donde se logró obtener un grupo de quince moléculas nuevas. De este grupo de moléculas solo son seleccionadas tres moléculas que corresponden a (R)-2T\_181 que presenta la adición de un grupo metoxilo del fenilo. Las otras dos moléculas son (R)-2T\_175 y (S)-2T\_175 que se diferencia de M890 por la eliminación de un átomo de fluor en el grupo fenilo de la molécula

(Brown *et al.*, 2012; Bonandi *et al.*, 2017). Además, que tiene ambas moléculas son enantiómeros entre sí. Estos cambios se detallan en las tablas 1 y 3.

### **Conformación estructural de las nuevas moléculas por docking molecular**

Una vez diseñados los ligandos en el programa VMD, se procede a realizar los estudios de acoplamiento molecular con el fin de comprender la interacción entre un ligando y una proteína blanco a nivel atómico. Estos estudios de acoplamiento molecular tienen dos objetivos: la predicción de la orientación de la unión proteína-ligando, y la estimación de la energía de interacción. Antes del inicio del proceso de acoplamiento, es necesario identificar el sitio de interés de la proteína donde los ligandos pueden unirse (Malathi & Ramaiah, 2018). Para el caso de la proteína G $\beta\gamma$  esta zona se encuentra ubicada en el *hotspot* del dímero donde se ha reportado la participación de los residuos ASP186, ASP228 y ASP246 (Fabián Cerda, Tesis Bioingeniería, 2012) sobre esta región se ha diseñado una caja virtual utilizando el programa AutoGrid complemento de Autodock Vina 4, identificando la conformación inicial de uno de los diastereoisómeros (R,R)-M554. Los nuevos ligandos se acoplan libremente en la zona la zona definida, mientras tanto, la proteína G $\beta\gamma$  presenta una estructura rígida en el docking para determinar la posición y conformación más probable de los ligandos (Meng *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos son clasificados en torno a una función scoring, y se seleccionaron aquellas conformaciones que posean menor energía. como resultados del acoplamiento para el grupo de veinte moléculas análogas a M554 y M890. Esta información estructural nos permitió conocer las coordenadas espaciales de los átomos que componen estos ligandos y de esta forma construir los sistemas G $\beta\gamma$ -molécula determinando la ubicación probable sobre la proteína, cuyos ligandos en todos los casos se disponen próximos a la tríada de ácidos aspárticos, que se encuentran limitados por la rejilla. Esta información extraída con esta técnica solo nos permite obtener una aproximación del sitio de asociación que se podría dar, pero la información más exacta nos lo proporciona la DM.

## Estudios de dinámica molecular para la selección de nuevas moléculas

La información estructural de las conformaciones de los ligandos sobre  $G\beta\gamma$  obtenida del docking fue sometida a simulaciones de DM para estudiar la evolución temporal de los ligandos y determinar la posible interacción potencial. Esta información se conoce mediante el cálculo de las fuerzas interatómicas y la resolución de las ecuaciones de movimiento que gobiernan la dinámica del sistema. Las simulaciones de DM muestrean el espacio de configuración y generan una trayectoria que sigue los movimientos moleculares en función del tiempo pudiendo realizar cálculos de energía libre aplicándose a sistemas macromoleculares de interés biológico y farmacéutico, tareas de suma importancia en el diseño de fármacos basado en la estructura (Sotriffer, 2006). A partir de la información que entrega la DM se utilizó el programa Amber con el fin de seleccionar desde el grupo de moléculas análogas a M554 y M890, para este fin se utilizó la molécula (R,R)-M554 a modo de guía y mediante estudios de MM-GBSA realizados al final de los 70 ns se seleccionaron las moléculas (R,S)-4M554\_2, (R)-2T\_181, (S)-2T\_175 y (R)-2T\_175 ya que presentan menor energía de asociación a la proteína  $G\beta\gamma$ .

La selección fue llevada a cabo considerando la DM de (R,R)-M554 por un tiempo de 20 ns iniciales que permitieron estabilizar el sistema y debido a los cambios del sitio de asociación se decidió extender la DM en 50 ns resultando en una simulación de biomoléculas de 70 ns totales. Los cálculos de energía por MM-GBSA se realizan al final de los primeros 20 ns y de los 70 ns lo que da lugar a dos etapas de selección de ligandos. Para las moléculas (R,S)-4M554\_2, (R)-2T\_181, (S)-2T\_175 y (R)-2T\_175 se estudiaron las interacciones en los últimos 50 ns de simulación, que además, corresponde a la porción estabilizada tanto para la proteína como para el ligando, como se observa en los gráficos de RMSD de los ligandos, mostrando una desviación de la estructura de  $G\beta\gamma$  cristalizada de aproximadamente 2 Å, lo que está de acuerdo con la literatura (Zhou *et al.*, 2008) y para los ligando se consideran distancias próximas a 5 Å en el RMSD (Kumar & Nussinov, 2002). En general los ligandos que cumplen con estas condiciones corresponden a (R)-2T\_175 y (R,S)-4M554\_2, por otro lado, la molécula (S)-2T\_175 presenta dos sets de conformaciones marcadas gráficamente, la primera abarca hasta los 17 ns en esta etapa el ligando interactúa sobre  $G\beta\gamma$  en el *hotspot* la segunda conformación se aleja parcialmente de la región de interés, pero permanece unida a  $G\beta\gamma$  (Yu *et al.*, 2012). Para (R)-2T\_181 presenta un desplazamiento superior a 10 Å con

respecto a la estructura que estaba al inicio de la DM, pero se termina estabilizando y manteniéndose constante en los últimos 50 ns sobre la región de interés en la proteína.

Los estudios de MM-GBSA nos permitieron determinar la energía libre de la molécula (R,R)-M554 con un valor de  $-19,5 \pm 4$  kcal/mol. Las interacciones entre la proteína y el ligando se mide en relación a la distancia entre los átomos con el programa VMD destacando que (R,R)-M554 establece interacciones representativas a lo largo de la trayectoria entre ellas, la más importante corresponde a la formación de un puente de hidrógeno con el aminoácido **TYR145**. Los puentes de hidrógeno son interacciones muy especiales porque la fuerza de la mayoría de los enlaces de hidrógeno se encuentra entre 10 y 40 kJ/mol, lo que los hace más fuertes que un enlace de Van der Waals típico (1 kJ/mol). Los enlaces de hidrógeno también son bastante direccionales. Por otro lado, los enlaces de hidrógeno son interacciones de corto alcance (Christensen & Hida, 1990). Esta característica, podría ser clave en la asociación a la proteína y en los efectos obtenidos en las pruebas electrofisiológicas con esta molécula. Además, predominan interacciones débiles como las del tipo las dipolo-dipolo inducido con residuos como, ARG314, **MET188**, MET101 y es capaz de establecer interacciones de tipo *stacking*  $\pi$ - $\pi$  con **TRP332** (grupo indol). Todas en conjunto favorecen este efecto inhibitor sobre la proteína G $\beta\gamma$ . En él estudio de la proteína G $\beta\gamma$  se diseñaron péptidos de unión a G $\beta\gamma$  determinando la participación de residuos en la asociación, a través de un inhibidor SIGK y se resaltó la importancia de los aminoácidos LYS57, TYR59, LEU117, **TYR145**, ASP186, **MET188**, ASN230 y **TRP332** que se encuentran ubicados en la superficie *hotspot* de la proteína G $\beta\gamma$  ya que serían claves en la modulación de varios efectores moleculares (Davis *et al.*, 2005).

Los nuevos ligandos propuestos y (R,R)-M554 se posicionan en un *core* mayoritariamente compuesto por aminoácidos hidrofóbicos y polares sin carga correspondiente al *hotspot* de G $\beta\gamma$ .

- 1) La primera molécula más favorecida es (R)-2T\_175 con una energía libre de  $-22 \pm 3$  Kcal/mol. Las interacciones que permiten la asociación son un puente de hidrogeno con VAL100. Entre otras interacciones no covalente estan las fuerzas dipolo-dipolo con **TYR59**. Las del tipo dipolo-dipolo inducido por el aminoácido MET101. Finalmente, los anillos aromáticos establecen interacciones de tipo *stacking*  $\pi$ - $\pi$  con TRP99.

- 2) La segunda molécula más favorecida es (S)-2T\_175 con una energía de  $-21 \pm 6,7$  Kcal/mol esta molécula corresponde al enantiómero de la molécula (R)-2T\_175, esta molécula se presenta como mezcla racémica. Además, este ligando presenta dos conformaciones en los gráficos de RMSD, pero se decide mostrar la imagen de la conformación que se ubica en el *hotspot* de  $G\beta\gamma$  a los 17 ns (Yu *et al.*, 2012) que corresponde a la primera conformación del gráfico (Figura 21). Las interacciones que permiten a asociación están dadas por las fuerzas de Van der Waals de tipo dipolo-dipolo con **TYR59**, ASP290. Las interacciones más débiles dipolo-dipolo inducido se dan con SER316. Por último, ocurre la asociación entre los anillos aromáticos de tipo *stacking*  $\pi$ - $\pi$  TRP99.
- 3) La siguiente molécula es (R,S)-4M554\_2 con una energía de  $-20 \pm 5$  Kcal/mol las interacciones que prevalecen en la asociación son las fuerzas de Van der Waals del tipo dipolo-dipolo con **TYR59**, **ASN230**, ASP290. Finalmente, el grupo del **TRP332** logra establecer interacción dipolo-dipolo. Para terminar, las interacciones más débiles dipolo-dipolo inducido con **TYR145**.
- 4) Para finalizar, la última molécula seleccionada es (R)-2T\_181 este ligando posee un enantiómero correspondiente a la molécula (S)-2T\_181, pero esta molécula se une a una región diferente al *hotspot* de la proteína  $G\beta\gamma$  y esta asociación requiere de una energía mayor, pero se presenta como mezcla racémica el compuesto. La molécula (R)-2T\_181 tiene una energía de unión de  $-20 \pm 3,9$  Kcal/mol las interacciones más fuertes es un puente de hidrogeno GLN75. Las siguientes interacciones dipolo-dipolo con SER98, ASP76. Finalmente, la última interacción débil es del tipo dipolo-dipolo inducido con GLN75.

Cabe recalcar, que los residuos destacados en negrita corresponden a los residuos que han sido estudiados sobre  $G\beta\gamma$  y que se ha demostrado su importancia en la función de ciertos efectores moleculares de alta relevancia fisiológica. Además, las moléculas que pasaron los ensayos *in silico* son aquellas que se mantienen en la misma zona que (R,R)-M554 o muy próximas a esta región y que además se lograron solubilizar bajo las condiciones empleadas en este estudio.

## **Toxicidad celular de nuevas moléculas análogas a M554 y M890**

En el diseño de fármacos es relevante considerar variados ensayos *in vitro* que permitan detectar la toxicidad de los ligandos. Para continuar con la búsqueda de inhibidores de G $\beta$  $\gamma$  en este estudio se evaluó un grupo de moléculas pequeñas M554\_175 (mezcla racémica), M554\_181 (mezcla racémica) y (R,S)-4M554\_2 que permitió determinar que ninguna de estas afecta la viabilidad celular de la línea HEK-293 expuestas a 24 horas. Sin embargo, los mecanismos mediante el cual un fármaco puede generar toxicidad son variados y en el caso de este estudio se consideró el poder reductor de las células como indicador de la viabilidad celular, este análisis es utilizado para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad. Este problema radica en que muchos de los fármacos enfrentan muchas dificultades para llegar al blanco celular, entre ellos podemos mencionar la posibilidad de que interaccionen sobre otra región dando como resultado un efecto adverso (Larsson *et al.*, 2020).

Para la búsqueda de nuevos ligandos es importante tomar en cuenta la solubilización que en algunos casos es bastante limitada, como en las moléculas 2M554\_180, 2M554\_178 (mezcla racémica), 2M554\_174 y 3M554\_5S (mezcla racémica) ligandos que no pudieron ser solubilizadas en las condiciones empleadas en materiales y métodos, debido a que forman precipitados por lo que se consideró descartar estos compuestos. Se deben realizar estudios de solubilidad más detallados para avanzar con el estudio de estas moléculas. Por el contrario, las moléculas pequeñas M554\_175, M554\_181 y (R,S)-4M554\_2 son solubles en DMSO a una concentración igual o inferior al 1% para los ensayos de viabilidad. A partir, de este estudio se proponen tres moléculas análogas a M554 principalmente con posible efecto inhibitor sobre el dímero G $\beta$  $\gamma$  ya que demostraron capacidad de unirse al *hotspot* de esta proteína. Para caracterizar de forma más específica la actividad de las nuevas moléculas es importante continuar con ensayos que permitan evaluar el rol directo sobre la función del GlyR.



## Diseño de fármacos y problemas de solubilidad

Esta información deja en evidencia que es necesario buscar nuevos métodos que faciliten nuevos transportadores que permitan llegar al fármaco a su blanco final. Actualmente, existen una variedad de distintos solventes y estrategias utilizados para la administración de fármacos con baja solubilidad (Deng *et al.*, 2020). Entre los nanotransportadores, se encuentran las ciclodextrinas oligosacáridos cíclicos anfifílicos. Las ciclodextrinas naturales  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se componen por 6, 7 y 8 unidades de dextrosa, respectivamente. Entre sus aplicaciones están; mejorar la solubilidad, la biodisponibilidad, aumentar la estabilidad, liberación controlada y mejorar la carga del fármaco características que se producen debido a su capacidad para formar un complejo de inclusión con la droga (Gadade & Pekamwar, 2020). En futuros ensayos, las moléculas mencionadas podrían solubilizarse con este tipo de estrategias.

Anteriormente, la HP- $\beta$ -CD se utilizó en los ensayos de comportamiento con el fin de aumentar la solubilidad de los compuestos M809\_4 y M809\_5 en una razón en masa de 1:20 para la formación del complejo de inclusión al que se le adiciono DMSO a bajas concentraciones (San Martin *et al.*, 2016).

Para la primera etapa de este estudio, estas nanopartículas son claves para disolver a M809\_4 y M809\_5 ligandos que al ser probados en ensayos de comportamiento se observa un aumento significativo de la recuperación motora en los ratones intoxicados de forma aguda con etanol. En él estudio de toxicidad asociada a la interferencia de estas moléculas sobre las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  se obtiene interferencia por parte de la molécula M809\_5. Este efecto podría deberse a que el diseño *in silico* desarrollado por el grupo de investigación se basa en la interferencia del *hotspot* del dímero  $\text{G}\beta\gamma$  región en donde se asocian varios efectores moleculares, ya que esta zona posee características claves para la interacción proteína-proteína. Para caracterizar de forma más específica la actividad de las nuevas moléculas es relevante continuar con ensayos *in vitro* que evalúen el efecto directo sobre la función del GlyR como se propone en los resultados previos de los anexos 2, 3 y 4 mediante la utilización de sondas de cloruro. Además, continuar con otros estudios de comportamiento que permitan reforzar los resultados obtenidos en el rotarod acelerado, como la medición de etanol en sangre y corroborar que el efecto encontrado en comportamiento animal mediante rotarod acelerado no se debe a diferencias en la concentración de alcohol en sangre.



Para la segunda etapa, las nuevas moléculas (R)-M554\_175, (S)-M554\_175, (R)-M554\_181 y (R,S)-4M554\_2 propuestas no presentaron problemas de solubilidad en las pruebas de viabilidad celular a pesar de que su estructura se basa en moléculas que han presentado problemas de solubilidad y estas moléculas necesitan ser sometidas a una serie de experimentos para caracterizar su efecto sobre el GlyR así como, ocurre también con M809\_4 y M809\_5.

Este trabajo de tesis contribuye en la búsqueda de nuevos inhibidores parciales de la interacción entre el dímero  $G\beta\gamma$  y el loop intracelular del GlyR asociación clave que desencadena en muchos de los efectos letales que se generan producto de la intoxicación aguda por etanol.



## CONCLUSIONES

Los estudios que permitieron validar la hipótesis estuvieron basados en ensayos *in vitro* que permitieron estudiar la toxicidad en neuronas, estudios *in vivo* que registraron la funcionalidad de las moléculas y finalmente estudios *in silico* que permitieron identificar y proponer nuevos ligandos en el sitio de unión a la proteína G $\beta\gamma$  con el propósito de encontrar moléculas líderes capaces de revertir los efectos que induce el etanol sobre la activación del GlyR.

- La aplicación aguda de etanol *in vitro* produjo disminución en la frecuencia de las transitorias de Ca<sup>2+</sup>. En el tratamiento con la molécula M809\_5 se obtuvo un efecto más marcado que se potencia al adicionar etanol. No obstante, la molécula M809\_4 por si sola o en presencia de etanol no parece alterar las transitorias de Ca<sup>2+</sup>.
- Los ensayos *in vivo* de rotarod acelerado se evaluó la recuperación motora en ratones intoxicados con etanol y los resultados obtenidos a los 15 minutos luego de la inyección con etanol demostraron la inducción de incoordinación motora con una latencia a caer de un 28 $\pm$ 4% del tiempo registrado en ratones control en ausencia de etanol. No obstante, en los animales tratados con la molécula M809\_4/EtOH este valor se registró en 63 $\pm$ 6% y para M809\_5/EtOH de 76 $\pm$ 5% esta data nos permitió concluir que la recuperación de los efectos de etanol en coordinación motora es más rápida en presencia de las moléculas M809\_4 y M809\_5, de forma significativa.
- Para continuar con la búsqueda de ligandos y considerando la evidencia científica que respalda a la molécula (R,R)-M554 se realizó estudios *in silico* mediante sustitución bioisostérica, docking y dinámica molecular de 70 ns con lo que se generaron las moléculas (R,S)-4M554\_2, (R)-2T\_181, (S)-2T\_175 y (R)-2T\_175 ya que presentaron menor energía de asociación a la proteína G $\beta\gamma$ .

- El sitio de asociación de los nuevos ligandos y de (R,R)-M554 involucraron los siguientes residuos; TYR59, GLN75, ASP76, SER98, TRP99, VA100, MET101, TYR145, SER147, ASP186, VAL187, MET188, ASN230, THR274, ASP290, ARG314, SER316, TRP332. Todos forman parte del *hotspot* de Gβγ.
- Las nuevas moléculas generadas interaccionaron *in silico* en el *hotspot* de la proteína Gβγ su utilización no reduce la viabilidad celular. Aunque es necesario continuar con más ensayos para caracterizar en detalle su capacidad inhibidora de los efectos de etanol. Además, se debe evaluar su interferencia sobre otras vías para evitar efectos no deseados.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, K. P., Salinas, A. G., & Lovinger, D. M. (2017). Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. In *Neuron* (Vol. 96, Issue 6, pp. 1223–1238). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.032>
- Aguayo, L G, & Pancetti, F. C. (1994). Ethanol modulation of the gamma-aminobutyric acidA- and glycine-activated Cl- current in cultured mouse neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270(1), 61–69.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035343>
- Aguayo, Luis G., Castro, P., Mariqueo, T., Muñoz, B., Xiong, W., Zhang, L., Lovinger, D. M., & Homanics, G. E. (2014). Altered sedative effects of ethanol in mice with  $\alpha 1$  glycine receptor subunits that are insensitive to  $G\beta\gamma$  modulation. *Neuropsychopharmacology*, 39(11), 2538–2548. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.100>
- Anderson, A. C. (2003). The Process of Structure-Based Drug Design. *Chemistry & Biology*, 10(9), 787–797. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2003.09.002>
- Anderson, W., Graham, B., Beveridge, N., Tooney, P., Brichta, A. y Callister R. (2009). Different forms of glycine- and GABAA-receptor mediated inhibitory synaptic transmission in mouse superficial and deep dorsal horn neurons. *Mol Pain* 5: 65
- Aprison, M. H., & Werman, R. (1965). The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sciences*, 4(21), 2075–2083. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(65\)90325-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(65)90325-5)
- Argel Y. (2019). "Búsqueda de análogos de M554 y M890 para la interacción con el dímero  $G\beta\gamma$  en regiones involucradas en al regulación del receptor de glicina" (Tesis Bioingeniería). Universidad de Concepción.
- Asociación Costarricense de Medicina Forense., M. M., & SciELO (2016). In *Medicina Legal de Costa Rica* (Vol. 33, Issue 2). Asociación Costarricense de Medicina Forense. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152016000200066](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152016000200066)
- Bading, H. (2000). Transcription-dependent neuronal plasticity: The nuclear calcium hypothesis. In *European Journal of Biochemistry* (Vol. 267, Issue 17, pp. 5280–5283).

<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01565.x>

- Bading, H., Ginty, D. D., & Greenberg, M. E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science*, *260*(5105), 181–186. <https://doi.org/10.1126/science.8097060>
- Bennett, J., & Dingledine, R. (n.d.). Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron*, *14*(2), 373–384. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90293-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90293-7)
- Blednov, Y. A., Benavidez, J. M., Black, M., Leiter, C. R., Osterndorff-Kahanek, E., & Harris, R. A. (2015). Glycine receptors containing  $\alpha 2$  or  $\alpha 3$  subunits regulate specific ethanol-mediated behaviors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *353*(1), 181–191. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.221895>
- Bonacci, T. M., Ghosh, M., Malik, S., & Smrcka, A. V. (2005). Regulatory Interactions between the Amino Terminus of G-protein  $\beta\gamma$  Subunits and the Catalytic Domain of Phospholipase C $\beta 2$ . *Journal of Biological Chemistry*, *280*(11), 10174–10181. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412514200>
- Bonandi, E., Christodoulou, M. S., Fumagalli, G., Perdicchia, D., Rastelli, G., & Passarella, D. (2017). The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. In *Drug Discovery Today* (Vol. 22, Issue 10, pp. 1572–1581). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.014>
- Bonner, W. A. (2000). Parity violation and the evolution of biomolecular homochirality. *Chirality*, *12*(3), 114–126. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-636X\(2000\)12:3<114::AID-CHIR3>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-636X(2000)12:3<114::AID-CHIR3>3.0.CO;2-N)
- Bosshard, H. R., Marti, D. N., & Jelesarov, I. (2004). Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION J. Mol. Recognit*, *17*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/jmr.657>
- Breitinger, U., Raafat, K. M., & Breitinger, H.-G. (2015). Glucose is a positive modulator for the activation of human recombinant glycine receptors. *Journal of Neurochemistry*,

134(6), 1055–1066. <https://doi.org/10.1111/jnc.13215>

- Burgos, C. F., Yévenes, G. E., & Aguayo, L. G. (2016). Structure and Pharmacologic Modulation of Inhibitory Glycine Receptors. *Molecular Pharmacology*, 90(3), 318–325. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105726>
- Carlson, H. A., & McCammon, J. A. (2000). Accommodating Protein Flexibility in Computational Drug Design. *Molecular Pharmacology*, 57(2).
- Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
- Cerda F. (2012). "Definición de una estructura química no proteica para la inhibición de los efectos del etanol sobre el receptor de glicina" (Tesis Bioingeniería). Universidad de Concepción.
- Chang, M. W., Ayeni, C., Breuer, S., & Torbett, B. E. (2010). Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina. *PloS One*, 5(8), e11955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011955>
- Chen, J., DeVivo, M., Dingus, J., Harry, A., Li, J., Sui, J., Carty, D. J., Blank, J. L., Exton, J. H., & Stoffel, R. H. (1995). A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5214), 1166–1169. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7761832>
- Chesnoy-Marchais, D., & Cathala, L. (2001). Modulation of glycine responses by dihydropyridines and verapamil in rat spinal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 13(12), 2195–2204. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01599.x>
- Christensen, B. N., & Hida, E. (1990). Protonation of histidine groups inhibits gating of the quisqualate/kainate channel protein in isolated catfish cone horizontal cells. *Neuron*, 5(4), 471–478. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90086-u](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90086-u)
- Clapham, D. E., & Neer, E. J. (1997). G PROTEIN  $\beta\gamma$  SUBUNITS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37(1), 167–203.

<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.167>

- Davies, P. A., Wang, W., Hales, T. G., & Kirkness, E. F. (2003). A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn<sup>2+</sup>. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 712–717. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208814200>
- Deitrich, R. A., Dunwiddie, T. V., Harris, R. A., & Erwin, V. G. (1989). Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmacological Reviews*, 41(4), 489–537. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2700603>
- Deng, Y., Zhang, X., Shen, H., He, Q., Wu, Z., Liao, W., & Yuan, M. (2020). Application of the Nano-Drug Delivery System in Treatment of Cardiovascular Diseases. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, p. 489). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00489>
- Dopico, A. M., & Lovinger, D. M. (2009). Acute alcohol action and desensitization of ligand-gated ion channels. *Pharmacological Reviews*, 61(1), 98–114. <https://doi.org/10.1124/pr.108.000430>
- Dutertre, S., Becker, C. M., & Betz, H. (2012). Inhibitory glycine receptors: An update. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 287, Issue 48, pp. 40216–40223). American Society for Biochemistry and Molecular Biology. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.408229>
- Fehlhammer, H., Bode, W., & Huber, R. (1977). Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, refined crystal structure and comparison with bovine trypsin. *J.Mol.Biol.*, 111, 415–438. <https://doi.org/10.2210/PDB1TGB/PDB>
- Finkelstein, A. V., Badretdinov, A. Y., & Ptitsyn, O. B. (1991). Physical reasons for secondary structure stability:  $\alpha$ -Helices in short peptides. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 10(4), 287–299. <https://doi.org/10.1002/prot.340100403>
- Fucile, S., De Saint Jan, D., De Carvalho, L. P., & Bregestovski, P. (2000). Fast potentiation of glycine receptor channels by intracellular calcium in neurons and transfected cells. *Neuron*, 28(2), 571–583. <https://doi.org/10.1016/S0896->

- Gadade, D. D., & Pekamwar, S. S. (2020). Cyclodextrin based nanoparticles for drug delivery and theranostics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(2), 166–183. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.022>
- Gallivan, J. P., & Dougherty, D. A. (1999). Cation- $\pi$  interactions in structural biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), 9459–9464. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449714>
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*, 28(3), 1317–1330. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Gerlt, J. A., Kreevoy, M. M., Cleland, W. W., & Frey, P. A. (1997). Understanding enzymic catalysis: The importance of short, strong hydrogen bonds. In *Chemistry and Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90069-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90069-7)
- Guzmán, L., Moraga-Cid, G., Avila, A., Figueroa, M., Yevenes, G. E., Fuentealba, J., & Aguayo, L. G. (2009). Blockade of ethanol-induced potentiation of glycine receptors by a peptide that interferes with G $\beta\gamma$  binding. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(3), 933–939. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.160440>
- Hagenston, A. M., & Baing, H. (2011). Calcium signaling in synapse-to-nucleus communicationI. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a004564. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004564>
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (1998). Nuclear calcium: A key regulator of gene expression. In *BioMetals* (Vol. 11, Issue 4, pp. 345–358). Springer. <https://doi.org/10.1023/A:1009257909785>
- Hardingham, G. E., Chawla, S., Johnson, C. M., & Bading, H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, 385(6613), 260–265. <https://doi.org/10.1038/385260a0>
- Harris, R. A., & Hood, W. F. (1980). Inhibition of synaptosomal calcium uptake by ethanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 213(3).



[https://doi.org/0022-3565/80/2133-0562\\$02.00/0](https://doi.org/0022-3565/80/2133-0562$02.00/0)

Hogg, R. C., Buisson, B., & Bertrand, D. (2005). Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochemical Pharmacology*, *70*(9), 1267–1276.

<https://doi.org/10.1016/J.BCP.2005.06.010>

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38, 27–28.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744570>

Ikeda, S. R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature*, *380*(6571), 255–258. <https://doi.org/10.1038/380255a0>

Illes, P., & Alexandre Ribeiro, J. (2004). Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *European Journal of Pharmacology*, *483*(1), 5–17.

<https://doi.org/10.1016/J.EJP.2003.10.030>

Jonas, P., & Burnashev, N. (1995). Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. In *Neuron* (Vol. 15, Issue 5, pp. 987–990). Neuron. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90087-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90087-X)

Katsurabayashi, S., Kubota, H., Wang, Z. M., Rhee, J. S., & Akaike, N. (2001). cAMP-Dependent Presynaptic Regulation of Spontaneous Glycinergic IPSCs in Mechanically Dissociated Rat Spinal Cord Neurons. *Journal of Neurophysiology*, *85*(1), 332–340.

<https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.1.332>

Khan, S. M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J.-P., Labbé, J.-C., Miller, G. J., & Hébert, T. E. (2013). The expanding roles of G $\beta\gamma$  subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacological Reviews*, *65*(2), 545–577.

<https://doi.org/10.1124/pr.111.005603>

Kirsch, J., & Betz, H. (1998). Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature*, *392*(6677), 717–720. <https://doi.org/10.1038/33694>

Kirsch, Joachim, Kuhse, J., & Betz, H. (1995). Targeting of Glycine Receptor Subunits to Gephyrin-Rich Domains in Transfected Human Embryonic Kidney Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *6*(5), 450–461. <https://doi.org/10.1006/MCNE.1995.1033>

- Kumada, T., Lakshmana, M. K., & Komuro, H. (2006). Reversal of neuronal migration in a mouse model of fetal alcohol syndrome by controlling second-messenger signalings. *Journal of Neuroscience*, *26*(3), 742–756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4478-05.2006>
- Kumar, S., & Nussinov, R. (2002). Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins. *ChemBioChem*, *3*(7), 604. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X)
- LANGOSCH, D., BECKER, C.-M., & BETZ, H. (1990). The inhibitory glycine receptor: A ligand-gated chloride channel of the central nervous system. *European Journal of Biochemistry*, *194*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19419.x>
- Larsson, P., Engqvist, H., Biermann, J., Werner Rönnerman, E., Forssell-Aronsson, E., Kovács, A., Karlsson, P., Helou, K., & Parris, T. Z. (2020). Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62848-5>
- Laube, B., Maksay, G., Schemm, R., & Betz, H. (2002). Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends in Pharmacological Sciences*, *23*(11), 519–527. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02138-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02138-7)
- Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*(5), 760–793. <https://doi.org/10.1007/PL00000899>
- Levitan, I. B. (1999). It is calmodulin after all, Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. In *Neuron* (Vol. 22, Issue 4, pp. 645–648). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80722-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80722-9)
- Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J., & Clapham, D. E. (1987). The  $\beta$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature*, *325*(6102), 321–326. <https://doi.org/10.1038/325321a0>
- 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>

- Lynch, J. W. (2009). Neuropharmacology Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, 56(1), 303–309.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.034>
- Magdalena Mora Torres. (2016). INTOXICACIÓN ALCOHÓLICA. *Medicina Legal de Costa Rica*, 33(2), 66–76. <http://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v33n2/1409-0015-mlcr-33-02-00066.pdf>
- Malathi, K., & Ramaiah, S. (2018). Bioinformatics approaches for new drug discovery: a review. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 34(2), 243–260.  
<https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1502984>
- Mandal, S., Moudgil, M., & Mandal, S. K. (2009). Rational drug design. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 625, Issues 1–3, pp. 90–100). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.065>
- Manzke T, Niebert M, Koch UR, Caley A, Vogelgesang S, Hulsmann S et al. (2010). Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor  $\alpha 3$  controls breathing in mice. *J Clin Invest* 120: 4118–4128
- 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.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8700149>
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Mislow K. (1999). Molecular Chirality. *Stereochem*, 22(7), 1–82.
- Molander, A., Lido, H. H., Lof, E., Ericson, M., & Soderpalm, B. (2007). THE GLYCINE REUPTAKE INHIBITOR ORG 25935 DECREASES ETHANOL INTAKE AND PREFERENCE IN MALE WISTAR RATS. *Alcohol and Alcoholism*, 42(1), 11–18.  
<https://doi.org/10.1093/alcalc/agl085>

- Mukherjee, S. (2013). Alcoholism and its Effects on the Central Nervous System. *Current Neurovascular Research*, 10(3), 256–262.  
<https://doi.org/10.2174/15672026113109990004>
- Muñoz, B., Gallegos, S., Peters, C., Murath, P., Lovinger, D. M., Homanics, G. E., & Aguayo, L. G. (2020). Influence of nonsynaptic  $\alpha 1$  glycine receptors on ethanol consumption and place preference. *Addiction Biology*, 25(2).  
<https://doi.org/10.1111/adb.12726>
- Nathan Brown. (2012). *Bioisosteres in Medicinal Chemistry*, Wiley (R. M. H. K. G. F. Nathan Brown (Ed.); Vol. 54). <https://www.wiley.com/en-us/Bioisosteres+in+Medicinal+Chemistry-p-9783527330157>
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 60–71.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2299>
- Onufriev, A., Bashford, D., & Case, D. A. (2004). Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(2), 383–394.  
<https://doi.org/10.1002/prot.20033>
- Perkins, D. I., Trudell, J. R., Crawford, D. K., Alkana, R. L., & Davies, D. L. (2010). Molecular targets and mechanisms for ethanol action in glycine receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 127(1), 53–65.  
<https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2010.03.003>
- Phillis, J. W., & Jhamandas, K. (1971). The effects of chlorpromazine and ethanol on in vivo release of acetylcholine from the cerebral cortex. *Comparative and General Pharmacology*, 2(7), 306–310. [https://doi.org/10.1016/0010-4035\(71\)90055-3](https://doi.org/10.1016/0010-4035(71)90055-3)
- Pittock, S. J., & Vincent, A. (2016). *Autoimmune neurology*. Elsevier.
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J., & Betz, H. (1992). The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *The EMBO Journal*, 11(12), 4305–4311.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385113>

- Racca, C., Gardiol, A. & Triller, A. (1998) Cell-specific dendritic localization of glycine receptor  $\alpha$  subunit messenger RNAs. *Neuroscience*, 84: 997–1012
- Rudnitskaya, A., Török, B., & Török, M. (2010). Molecular docking of enzyme inhibitors. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38(4), 261–265.  
<https://doi.org/10.1002/bmb.20392>
- Sagné, C., El Mestikawy, S., Isambert, M.-F., Hamon, M., Henry, J.-P., Giros, B., & Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Letters*, 417(2), 177–183.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01279-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01279-9)
- Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 3(2), 198–210. <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>
- San Martín, L., Cerda, F., Jin, C., Jiménez, V., Yébenes, G. E., Hernandez, T., Nova, D., Fuentealba, J., Aguayo, L. G., & Guzmán, L. (2016). Reversal of Ethanol-induced Intoxication by a Novel Modulator of G $\beta\gamma$  Protein Potentiation of the Glycine Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(36), 18791–18798.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.740555>
- San Martín L. (2016). “Inhibición de la potenciación del receptor de glicina por etanol utilizando péptidos y moléculas pequeñas que se unen al dímero G $\beta\gamma$  en modelos *in vitro* e *in vivo*” (Tesis doctorado Ciencias Biológicas). Universidad de Concepción.
- Sánchez, A., Yébenes, G. E., San Martín, L., Burgos, C. F., Moraga-Cid, G., Harvey, R. J., & Aguayo, L. G. (2015). Control of ethanol sensitivity of the glycine receptor  $\alpha 3$  subunit by transmembrane 2, the intracellular splice cassette and C-terminal domains. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(1), 80–90.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.114.221143>
- Scott, J. K., Huang, S. F., Gangadhar, B. P., Samoriski, G. M., Clapp, P., Gross, R. A., Taussig, R., & Smrcka, A. V. (2001). Evidence that a protein-protein interaction “hot

spot” on heterotrimeric G protein betagamma subunits is used for recognition of a subclass of effectors. *The EMBO Journal*, 20(4), 767–776.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.767>

SENDA-MINSAL. (2018). *Programa Planes de Tratamiento y Rehabilitación De Personas con Problemas Derivados del Consumo de Drogas Ilícitas u otras Sustancias Estupefacientes o Psicotrópicas*. [http://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/2015/06/20180801\\_Glosa05\\_Informe\\_Semestral\\_2018\\_Adultos.pdf](http://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/2015/06/20180801_Glosa05_Informe_Semestral_2018_Adultos.pdf)

SENDA-MINSAL, G. de C. (2016). *EL CONSUMO DE ALCOHOL EN CHILE: SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y REGIONAL*. [http://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/media/estudios/otrosSENDA/2016\\_Consumo\\_Alcohol\\_Chile.pdf](http://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/media/estudios/otrosSENDA/2016_Consumo_Alcohol_Chile.pdf)

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>

Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., Takahashi, R., Kitazawa, S., & Hattori, N. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods*, 189(2), 180–185.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>

Söderpalm, B., Lidö, H. H., & Ericson, M. (2017). The Glycine Receptor-A Functionally Important Primary Brain Target of Ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(11), 1816–1830. <https://doi.org/10.1111/acer.13483>

Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E., & Sigler, P. B. (1996). Crystal structure of a GA protein  $\beta\gamma$ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature*, 379(6563), 369–374.  
<https://doi.org/10.1038/379369a0>

Sotriffer, C. A. (2006). Molecular Dynamics Simulations in Drug Design. In *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* (pp. 1153–1160). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9\\_0820](https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_0820)

Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F. T., Jackson, T. R., Sternweis, P. C., & Hawkins, P. T. (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is

activated by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Cell*, 77(1), 83–93. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90237-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90237-2)

Tang, W., Gilman, A., Dingus, J., Harry, A., Li, J., Sui, J., Carty, D., Blank, J., Exton, J., Stoffel, R., & et, al. (1991). Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science*, 254(5037), 1500–1503. <https://doi.org/10.1126/science.1962211>

Tara L. Davis, ‡,§, Tabet M. Bonacci, ‡,¶, Stephen R. Sprang, \*,§,⊥ and, & Alan V. Smrcka\*, ¶,#. (2005). *Structural and Molecular Characterization of a Preferred Protein Interaction Surface on G Protein  $\beta\gamma$  Subunits*†. <https://doi.org/10.1021/BI050655I>

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>

Vaello, M. L., Ruiz-Gómez, A., Lerma, J., & Mayor, F. (1994). Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 2002–2008. <https://www.jbc.org/content/269/3/2002.short>

Vena, A. A., Zandy, S. L., Cofresí, R. U., & Gonzales, R. A. (2020). Behavioral, neurobiological, and neurochemical mechanisms of ethanol self-administration: A translational review. *Pharmacology & Therapeutics*, 212, 107573. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107573>

Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>

Weng, G., Li, J., Dingus, J., Hildebrandt, J. D., Weinstein, H., & Iyengar, R. (1996). Gbeta subunit interacts with a peptide encoding region 956-982 of adenylyl cyclase 2. Cross-linking of the peptide to free Gbetagamma but not the heterotrimer. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(43), 26445–26448.



<https://doi.org/10.1074/JBC.271.43.26445>

Woodward, J. J., & Pava, M. (2012). Ethanol Inhibition of Up-States in Prefrontal Cortical Neurons Expressing the Genetically Encoded Calcium Indicator GCaMP3.

*Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36(5), 780–787.

<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01674.x>

World Health Organization. (2018). *Global status report on alcohol and health*.

<https://doi.org/ISBN 978-92-4-156563-9>

World Health Organization 2014. (2014). *Global status report on alcohol and health 2014*.

<http://apps.who.int/iris/handle/10665/112736>

Yévenes, G. E., Moraga-Cid, G., Avila, A., Guzmán, L., Figueroa, M., Peoples, R. W., & Aguayo, L. G. (2010). Molecular Requirements for Ethanol Differential Allosteric Modulation of Glycine Receptors Based on Selective G $\beta\gamma$  Modulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30203. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.134676>

Yévenes, G. E., Moraga-Cid, G., Guzmán, L., Haeger, S., Oliveira, L., Olate, J., Schmalzing, G., & Aguayo, L. G. (2006). Molecular determinants for G protein betagamma modulation of ionotropic glycine receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39300–39307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608272200>

Yévenes, G. E., Moraga-Cid, G., Peoples, R. W., Schmalzing, G., & Aguayo, L. G. (2008). A selective G $\beta\gamma$ -linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20523. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0806257105>

Yévenes, G. E., Peoples, R. W., Tapia, J. C., Parodi, J., Soto, X., Olate, J., & Aguayo, L. G. (2003). Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature Neuroscience*, 6(8), 819–824. <https://doi.org/10.1038/nn1095>

Yu, X., Sigler, S. C., Hossain, D., Wierdl, M., Gwaltney, S. R., Potter, P. M., & Wadkins, R. M. (2012). Global and local molecular dynamics of a bacterial carboxylesterase provide insight into its catalytic mechanism. *Journal of Molecular Modeling*, 18(6), 2869–2883. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1308-9>

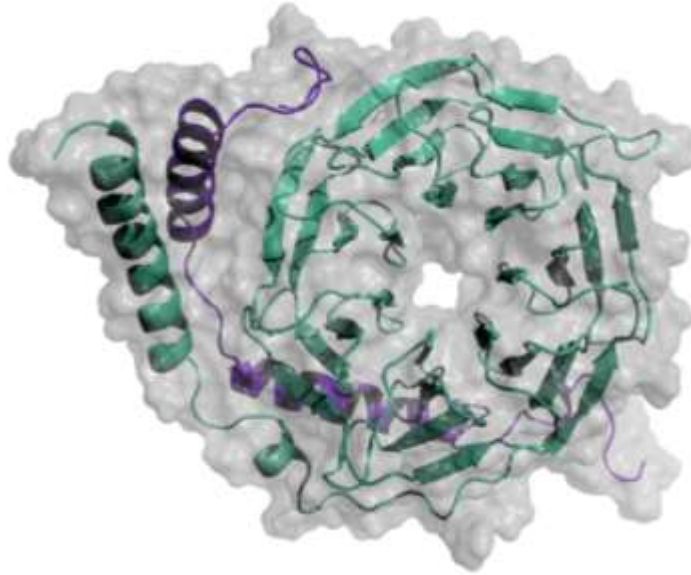


- Yuriev, E., Agostino, M., & Ramsland, P. A. (2011). Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 24(2), 149–164. <https://doi.org/10.1002/jmr.1077>
- Zafra, F., Aragón, C., & Giménez, C. (1997). Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Molecular Neurobiology*, 14(3), 117–142. <https://doi.org/10.1007/BF02740653>
- Zhang, X.-B., Sun, G.-C., Liu, L.-Y., Yu, F., & Xu, T.-L. (2008). Alpha2 subunit specificity of cyclothiazide inhibition on glycine receptors. *Molecular Pharmacology*, 73(4), 1195–1202. <https://doi.org/10.1124/mol.107.042655>
- Zhou, R., Eleftheriou, M., Hon, C.-C., Germain, R. S., Royyuru, A. K., & Berne, B. J. (2008). Massively parallel molecular dynamics simulations of lysozyme unfolding. *IBM Journal of Research and Development*, 52(1.2), 19–30. <https://doi.org/10.1147/rd.521.0019>

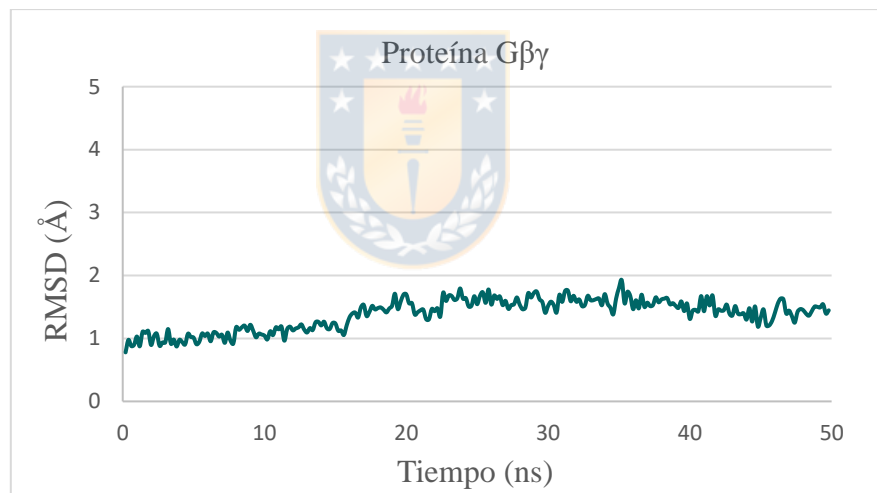


## ANEXOS

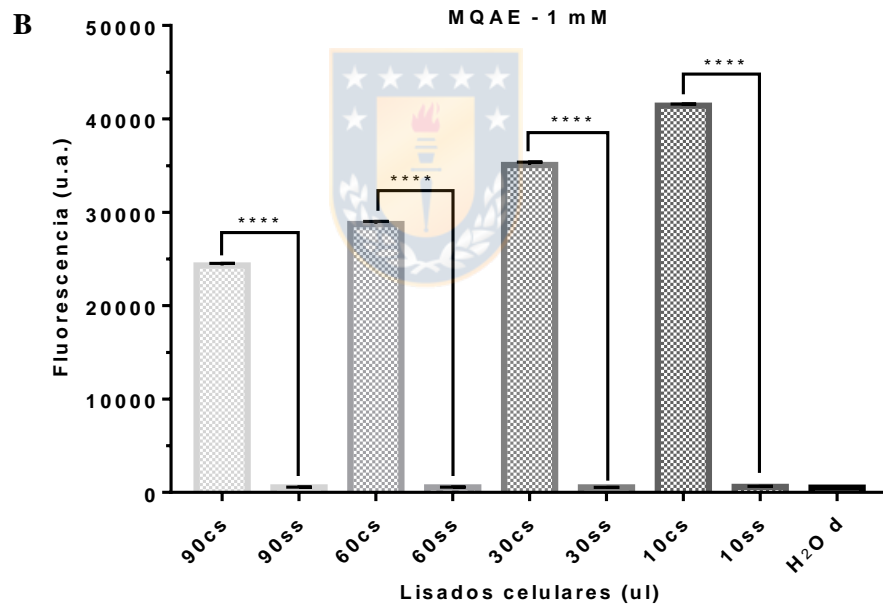
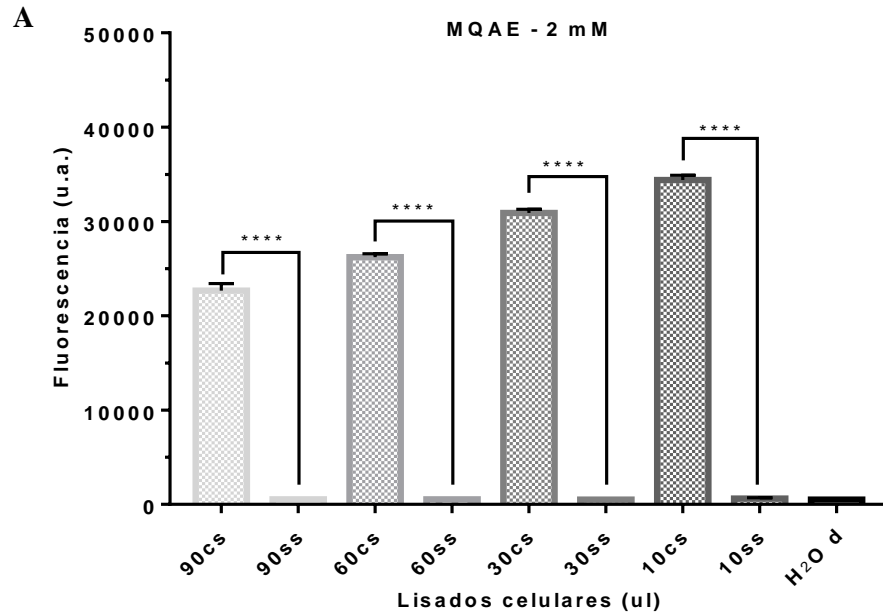
A



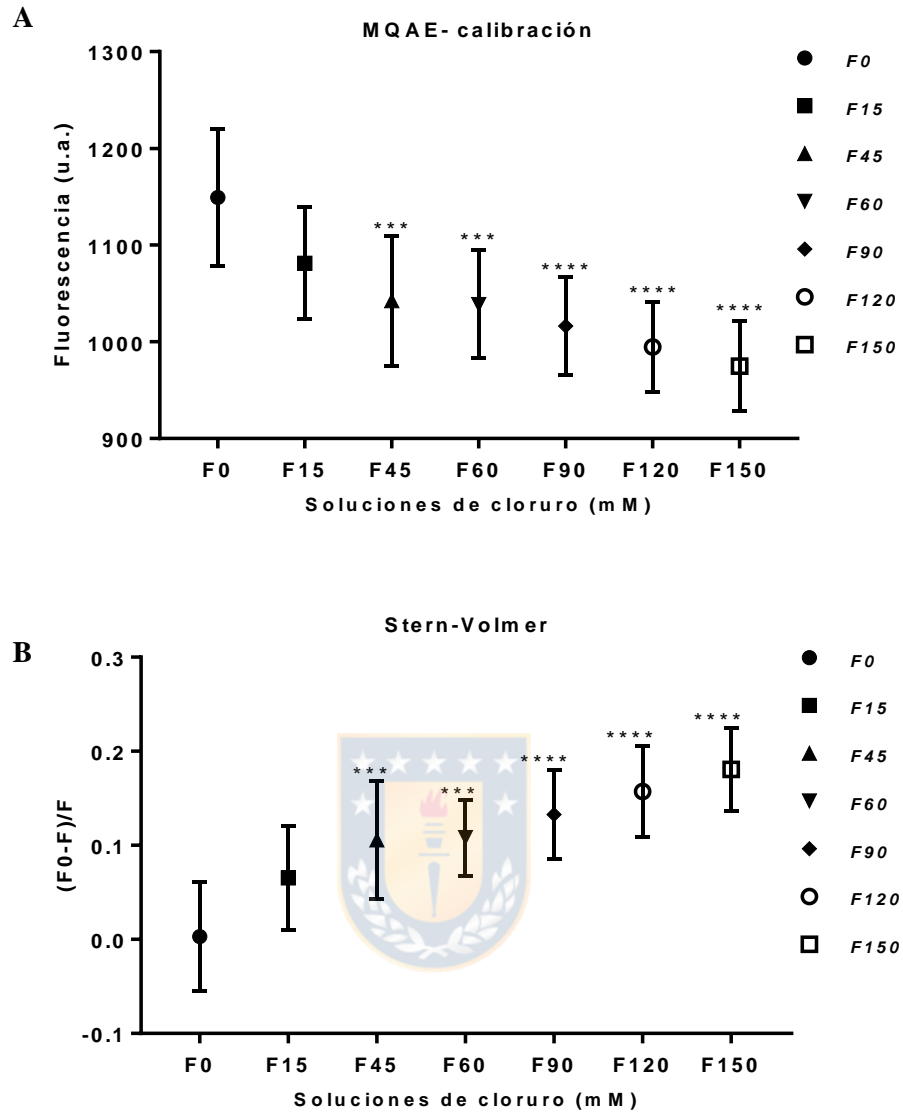
B



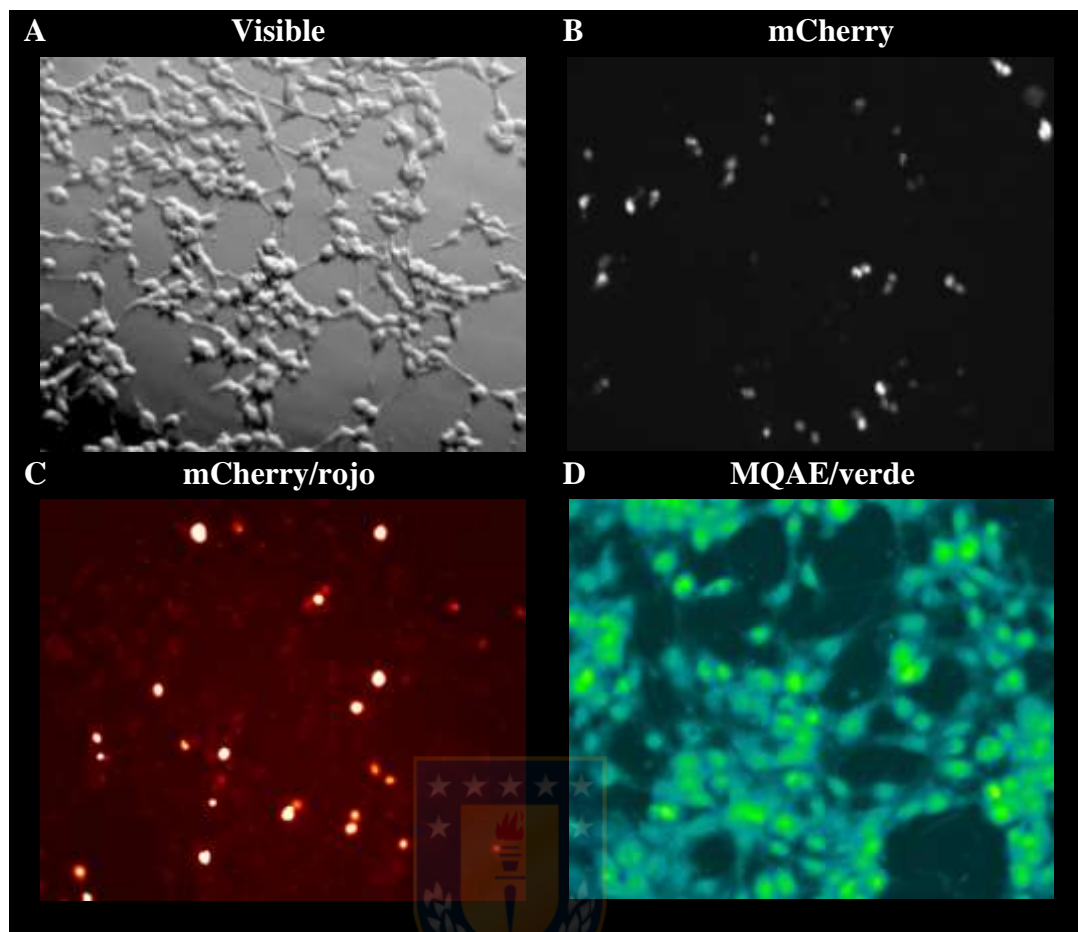
**Anexo 1: Control de la Proteína G $\beta\gamma$ .** En A se observa la proteína a través de su estructura secundaria al final de los 70 ns totales coloreando las cadenas “ $\gamma$ ” en morado, la cadena “ $\beta$ ” en celeste y en color gris se visualiza la superficie de las cadenas laterales de los aminoácidos. Para B se representa gráficamente el RMSD en los últimos 50 ns manteniéndose con un rango inferior a 2 Å. Representación con Pymol.



**Anexo 2: Evaluación funcional de la sonda a través de lisados celulares de HEK-293 con MQAE 1 mM y 2 mM.** En la gráfica A y B se representa un aumento en la fluorescencia a medida que disminuye el volumen de lisados celulares debido a que el mecanismo funcional de la sonda se produce por un apagamiento de la fluorescencia a medida que interacciona con iones de cloruro. Los lisados celulares que son tratados con sonda (CS) y en los casos donde no se utiliza la sonda (SS) son comparados con respecto el control negativo realizado con agua destilada (H<sub>2</sub>Od) (n=3). Promedio  $\pm$  SD (*One-Way ANOVA test Tukey*,  $p < 0,05$ ).



**Anexo 3: Fluorescencia en células HEK-293 tratadas con la sonda MQAE 1 mM por 12hrs y Gráfico de Stern-Volmer.** En A se observa el decaimiento de la fluorescencia a través de soluciones sin iones de cloruro (F0) y soluciones con iones de cloruro que van aumentando en mM (15, 45, 60, 90, 120, 150) esta disminución de la fluorescencia es característico de la sonda MQAE. En B la gráfica muestra la curva representada mediante un ajuste de curva de mínimos cuadrados y la pendiente de esta gráfica corresponde a la constante de Stern-Volmer denominada  $K_{sv} = 26,8 \pm 1,5 \text{ M}^{-1}$  (Sonda intracelular) ( $n=3$ ). Promedio  $\pm$  SD (*One-Way ANOVA test Tukey*,  $p < 0,05$ ).



**Anexo 4: Co-trasfección con los plásmidos de mCherry y la subunidad  $\alpha 1$ -GlyR en la línea celular HEK-293 con posterior incubación de MQAE.** En A se observan células HEK-293 luego de ser expuestas a la co-trasfección e incubación con MQAE en el espectro visible. En B las células con el plásmido de la proteína mCherry a  $\lambda=525$  nm y el plásmido de la subunidad  $\alpha 1$ -GlyR cuya transfección se llevó acabo a una concentración de 0,2 ng/ul por cada pocillo (placa de 96) con las células HEK-293 a una confluencia del 60% por un periodo de expresión de 12 horas. En C se visualizan las mismas condiciones expuestas en B, pero añadiendo un filtro rojo a la imagen. En D las células con la sonda MQAE a 1mM por un periodo de 12 horas a una  $\lambda= 460$ nm en medio celular F0 (solución libre cloruro). Aumento del microscopio de 20X.