



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**

**DIRECCION DE POSTGRADO FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE MAGISTER EN NEUROBIOLOGIA**

**DISEÑO DE MOLÉCULAS ALOSTÉRICAS SELECTIVAS QUE  
MODULEN LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR DE GLICINA QUE  
PORTA LA MUTACIÓN R271Q CAUSANTE DE LA  
ENFERMEDAD HIPERREKPLEXIA**

Tesis presentada para optar el grado de Magister en Neurobiología

**POR: VICTORIA PAZ OVIEDO PINO**

**PROFESOR GUIA: DR. GUSTAVO ALONSO MORAGA CID**

**PROFESOR CO-GUIA: DR. DAVID MAURICIO RAMÍREZ SÁNCHEZ**

**Concepción, Chile. Julio, 2025.**

Esta tesis fue realizada en los Departamentos de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes del comité evaluador:

Profesor Guía

---

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

Profesor Co-Guía

---

Dr. David Ramírez Sánchez.  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad de Concepción.

Comisión Evaluadora:

---

Dra. Evelyn Jara Fernández.  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad de Concepción.

---

Dr. Carlos Burgos Arias.  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad de Concepción.

---

Dr. Patricio Iturriaga Vásquez.  
Facultad de Ingeniería y Ciencias.  
Universidad de la Frontera.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

A mi madre, por su amor incondicional,  
a mi hermana, por su apoyo constante,  
y a todos los que me acompañaron en este camino.  
Gracias por estar siempre a mi lado  
y hacer posible este logro.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este magíster ha sido una etapa intensa y transformadora, en la que no solo adquirí nuevos conocimientos, sino que también crecí como persona. A pesar de que aún me queda camino por recorrer, valoro profundamente las experiencias vividas y a las personas que me acompañaron en este proceso.

Quiero comenzar agradeciendo a mi familia, en especial a mi mamá, quien me dio el impulso que necesitaba para continuar en la investigación. Al principio tenía dudas sobre si realmente debía seguir este camino, pero ella me recordó con claridad lo mucho que me apasiona esta área. A mi hermana, que siempre está ahí para apoyarme y consentirme en todo momento, incluso cuando, por ser la mayor, quizás debería ser al revés. A mi tía Isabel, quien ha sido como una segunda madre para mí, y que siempre me ha acompañado con cariño y confianza en todas mis decisiones. Y a mi Yuki, mi gato, quien cada vez que viajo a casa me recibe con cariño y ternura, ayudándome a aliviar mis preocupaciones, aunque sea por un momento.

Agradezco profundamente a mis tutores. Al Dr. Gustavo Moraga, por darme la oportunidad de aprender y explorar nuevas experiencias en la parte experimental. Fue un camino difícil al principio, pero juntos supimos resolver los desafíos. Al Dr. David Ramírez, por estar presente desde mi pregrado y acompañarme con paciencia, guía y apoyo en cada etapa de este proceso.

A mis compañeros del laboratorio del Departamento de Fisiología, gracias por compartir sus conocimientos y por su constante disposición para ayudarme durante el desarrollo de esta tesis. A mis compañeros del Departamento de Farmacología, y en especial a RamírezLab, gracias por el compañerismo, por las conversaciones científicas, los buenos chismes, las risas y los juegos que tanto hicieron más llevadero el día a día en el laboratorio.

Gracias a todos quienes fueron parte de este camino. Cada uno, con su presencia, apoyo y palabras, aportó algo valioso a este proceso que hoy concluye.

"El querer saber... Esa curiosidad... Es la fuerza motora original detrás de toda la ciencia." - Ishigami Senkuu (Dr. Stone).

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	10
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	11
RESUMEN .....	16
ABSTRACT .....	17
INTRODUCCIÓN .....	18
Generalidades de la patología Hiperekplexia .....	18
Generalidades del Receptor de glicina .....	20
Mutación en el Receptor de Glicina Alfa 1 (RGl $\alpha$ 1) .....	24
Tratamientos actuales para hiperekplexia .....	27
Importancia de las herramientas computacionales .....	29
Importancia de la validación experimental .....	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	36
Hipótesis .....	36
Objetivo general .....	37
Objetivos específicos (OE) .....	37
METODOLOGÍA .....	38
OE1. Identificación del sitio susceptible de modulación de la actividad de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q) .....	38

OE1.A1. Selección de la proteína cristalizada .....	38
OE1. A2. Identificación del sitio de unión del Propofol .....	39
OE2. Diseño de moléculas asistido por computador que se unan al potencial sitio de unión de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).....	42
OE2.A1. Diseño <i>de novo</i> de moléculas moduladoras.....	42
OE3. Cribado virtual de moléculas disponibles en bases de datos comerciales. ....	43
OE3.A1. Detección virtual basada en la forma de las moléculas diseñadas <i>de novo</i> .....	43
OE3.A2. <i>Docking</i> molecular.....	44
OE3.A3. Post-procesamiento de resultados de <i>docking</i> mediante predicción de energía libre de unión.....	45
OE3.A4. Predicción de las propiedades ADMET .....	45
OE4. Caracterización farmacológica de las moléculas con resultados más promisorios, mediante electrofisiología. ....	46
OE4.A1. Cultivo celular.....	46
OE4.A2. Transfección.....	46
OE4.A3. Preparación de las soluciones y pipetas .....	47
OE4.A4. Registros Electrofisiológico .....	48
OE4.A4. Evaluación <i>in silico</i> de las moléculas más potenciales a partir de los registros electrofisiológicos. ....	49

RESULTADOS.....	51
OE1. Identificación del sitio susceptible de modulación de la actividad de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).....	51
OE1.A1. Selección de la proteína cristalizada .....	51
OE1. A2. Identificación del sitio de unión del Propofol .....	56
OE2. Diseño de moléculas asistido por computador que se unan al potencial sitio de unión de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).....	65
OE2.A1. Diseño <i>de novo</i> de moléculas moduladoras.....	65
OE3. Cribado virtual de moléculas disponibles en bases de datos comerciales .....	73
OE3.A1. Detección virtual basada en la forma de las moléculas diseñadas <i>de novo</i> .....	73
OE3.A2. <i>Docking</i> molecular.....	75
OE3.A3. Post-procesamiento de resultados de <i>docking</i> mediante predicción de energía libre de unión.....	76
OE3.A4. Predicción de las propiedades ADMET.....	78
OE4. Caracterización farmacológica de las moléculas con resultados más promisorios, mediante electrofisiología. ....	80
OE4.A4. Registros Electrofisiológico. ....	80
OE4.A4. Evaluación <i>in silico</i> de las moléculas más potenciales a partir de los registros electrofisiológicos. ....	87

DISCUSIÓN .....	96
CONCLUSIÓN .....	100
BIBLIOGRAFÍA .....	101

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Estructuras cristalográficas del RGl $\alpha$ 1 en estado conformacional abierto de especie <i>Danio rerio</i> unido a glicina. ....	52
<b>Tabla 2:</b> Resultados de docking molecular de propofol y cálculo de energía libre de unión en RGl $\alpha$ 1 R271Q. ....	58
<b>Tabla 3:</b> Agrupamiento de las moléculas generadas mediante diseño <i>de novo</i> en 5 clúster. ....	72
<b>Tabla 4:</b> Moléculas seleccionadas tras filtrado de permeabilidad de la BHE y solubilidad. ....	79

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1:</b> Proteínas sinápticas implicadas en la enfermedad de Hiperekplexia. .....	19
<b>Figura 2:</b> Topología y estructura de la familia de canales iónicos dependientes de ligando. ....	22
<b>Figura 3:</b> Esquema de las conformaciones espaciales del RGli. ....	24
<b>Figura 4:</b> Cambios conformacionales del receptor de glicina asociados a la interacción Q226-R271 y su mutación R271Q.....	26
<b>Figura 6:</b> Representación molecular basados en átomos, fragmentos y reacciones para la aspirina. ....	32
<b>Figura 7:</b> Perfiles de expansión del poro en estructuras cristalográficas de conformación abierta. ....	54
<b>Figura 8:</b> Comparación del perfil del poro y aminoácidos involucrados en la apertura y cierre del RGli $\alpha$ 1. ....	55
<b>Figura 9:</b> Identificación de cavidades en la región transmembranal del RGli $\alpha$ 1 R271Q. ....	57
<b>Figura 10:</b> Residuos de la cavidad con el propofol en la interfaz entre las cadenas A y B del RGli $\alpha$ 1 R271Q.....	59
<b>Figura 11:</b> RMSD y RMSF correspondiente al backbone del RGli $\alpha$ 1 R271Q y de las 5 moléculas de propofol durante las DMs. ....	61
<b>Figura 12:</b> Comportamiento del Propofol en el sitio de unión del RGli $\alpha$ 1 R271Q durante los 500 ns de DMs.....	62

<b>Figura 13:</b> Frecuencia de interacción del propofol con los residuos de la cavidad del RGl $\alpha$ 1 R271Q durante las DMs. ....	64
<b>Figura 14:</b> Moléculas diseñadas de novo con fragmento de partida el fenol. ....	70
<b>Figura 15:</b> Análisis de Clústeres: Dendrograma, Penalización de Kelley y Distancia de Similitud.....	71
<b>Figura 16:</b> Distribución de las moléculas según el <i>score</i> de similitud en el cribado virtual.....	74
<b>Figura 17:</b> Distribución de moléculas seleccionadas en cada etapa del <i>docking</i> molecular HTVS, SP y XP en función de su <i>docking score</i> .....	75
<b>Figura 18:</b> Distribución de la energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{Bind}}$ ) de las moléculas obtenida del <i>docking</i> molecular XP y selección de aquellas con un $\Delta G_{\text{Bind}}$ menor al del propofol. ....	77
<b>Figura 19:</b> Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por Z1545990911 en RGl $\alpha$ 1 WT. ....	81
<b>Figura 20:</b> Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por Z319331018 en RGl $\alpha$ 1 WT. ....	82
<b>Figura 21:</b> Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por Z26395601 en RGl $\alpha$ 1 WT. ....	83
<b>Figura 22:</b> Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por Z1544898481 en RGl $\alpha$ 1 WT. ....	84
<b>Figura 23:</b> Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por la molécula Z366057622 en RGl $\alpha$ 1 WT y RGl $\alpha$ 1 R271Q.....	86

<b>Figura 24:</b> Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por la molécula Z237705572 en RGl $\alpha$ 1 WT y RGl $\alpha$ 1 R271Q.....	87
<b>Figura 25:</b> RMSD y RMSF del complejo RGl $\alpha$ 1-Z237705572 en WT y mutante.....	89
<b>Figura 26:</b> RMSD y RMSF del complejo RGl $\alpha$ 1-Z366057622 en WT y mutante.....	91
<b>Figura 27:</b> Comportamiento de las moléculas Z237705572 y Z366057622 en el sitio de unión del RGl $\alpha$ 1 WT y R271Q durante 1000 ns de DMs. ....	93
<b>Figura 28:</b> Frecuencia de interacción de las moléculas Z366057622 y Z237705572 con los residuos de la cavidad del RGl $\alpha$ 1 WT y R271Q durante las DMs.....	95

## **ABREVIATURAS**

ADMET: Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad.

BD: Base de datos.

BHE: Barrera hematoencefálica.

CV: Cribado Virtual.

DIFAC: Diseño de Fármacos asistido por computadora.

DMs: Dinámicas Moleculares.

EC20: Concentración Efectiva al 20%.

EC50: Concentración Efectiva al 50%.

ECD: Dominio extracelular.

FDA: Food and Drug Administration.

HEK: Células embrionarias de riñón humano.

HTVS: High-Throughput Virtual Screening.

IC50: Concentración Inhibitoria al 50%.

LBVS: Cribado Virtual Basado en el Ligando.

MM-GBSA: Molecular Mechanics with Generalized Born and Surface Area solvation.

PDB: Protein Data Bank.

PLIP: Protein-Ligand Interaction Profiler.

QED: Quantitative Estimate of Drug-likeness.

QSAR: Relación Cuantitativa Estructura-Actividad.

RGABA<sub>A</sub>: Receptor de GABA tipo A.

RGli: Receptor de Glicina.

RGli $\alpha$ 1: Receptor de Glicina Alfa 1.

RMSD: Root Mean Square Deviation of Atomic Positions.

RMSF: Root Mean Square Fluctuation.

SBDD: Structure-based drug design.

SEM: Error Estándar de la Media.

SP: Standard Precision.

TM: Transmembrana.

VIAAT: Transportador Vesicular de Aminoácidos Inhibitorio.

WT: Tipo Salvaje.

XP: Extra-Precision.

## RESUMEN

La Hiperekplexia es una rara enfermedad neurológica que se caracteriza por una respuesta de sobresalto exagerado y una rigidez muscular grave generalizada o intermitente. Las mutaciones descritas en el gen GLRA1 producen la disfunción del GlyR $\alpha$ 1 que lleva a un descontrol de la excitabilidad de la red neuronal. La mutación R271Q en RGLi $\alpha$ 1 no afecta la expresión del receptor en la membrana, pero altera la activación del canal por su agonista (glicina). A la fecha, se ha demostrado que propofol, un anestésico general intravenoso es capaz de recuperar la función en RGLi $\alpha$ 1 R271Q.

Dado este antecedente, este proyecto tiene como objetivo identificar nuevas moléculas capaces de restaurar la función del receptor de glicina mutante. Utilizando herramientas bioinformáticas, se empleó la estructura del receptor RGLi $\alpha$ 1 (PDB ID: 7M6S) para identificar una cavidad putativa asociada con la unión de propofol. Esta cavidad fue utilizada como base para el diseño de moléculas *de novo*. A continuación, se llevó a cabo un cribado virtual basado en la similitud de forma, utilizando diversas bases de datos. Las moléculas seleccionadas fueron filtradas según los resultados obtenidos en estudios de acoplamiento molecular y predicciones de energía libre de unión. Como resultado, se seleccionaron 11 moléculas candidatas, las cuales 6 moléculas fueron sometidas a evaluación experimental mediante registros electrofisiológicos. Los resultados obtenidos mostraron un potencial para la recuperación de la funcionalidad del receptor mutado.

## ABSTRACT

Hyperekplexia is a rare neurological disorder characterized by an exaggerated startle response and severe, generalized or intermittent muscle stiffness. Mutations described in the *GLRA1* gene lead to dysfunction of the GlyR $\alpha$ 1 receptor, resulting in a loss of control over neuronal network excitability. The R271Q mutation in RGly $\alpha$ 1 does not affect receptor expression at the membrane but alters channel activation by its agonist (glycine). To date, it has been shown that propofol, an intravenous general anesthetic, is capable of restoring function in RGly $\alpha$ 1 R271Q.

Given this background, the aim of this project is to identify new molecules capable of restoring the function of the mutant glycine receptor. Using bioinformatic tools, the structure of the RGly $\alpha$ 1 receptor (PDB ID: 7M6S) was used to identify a putative cavity associated with propofol binding. This cavity served as the basis for *de novo* molecule design. A virtual screening based on shape similarity was then carried out using various databases. The selected molecules were filtered according to the results obtained from molecular docking studies and predicted binding free energy. As a result, 11 candidate molecules were selected, of which 6 were subjected to experimental evaluation through electrophysiological recordings. The results showed potential for restoring the functionality of the mutated receptor.

## **INTRODUCCIÓN**

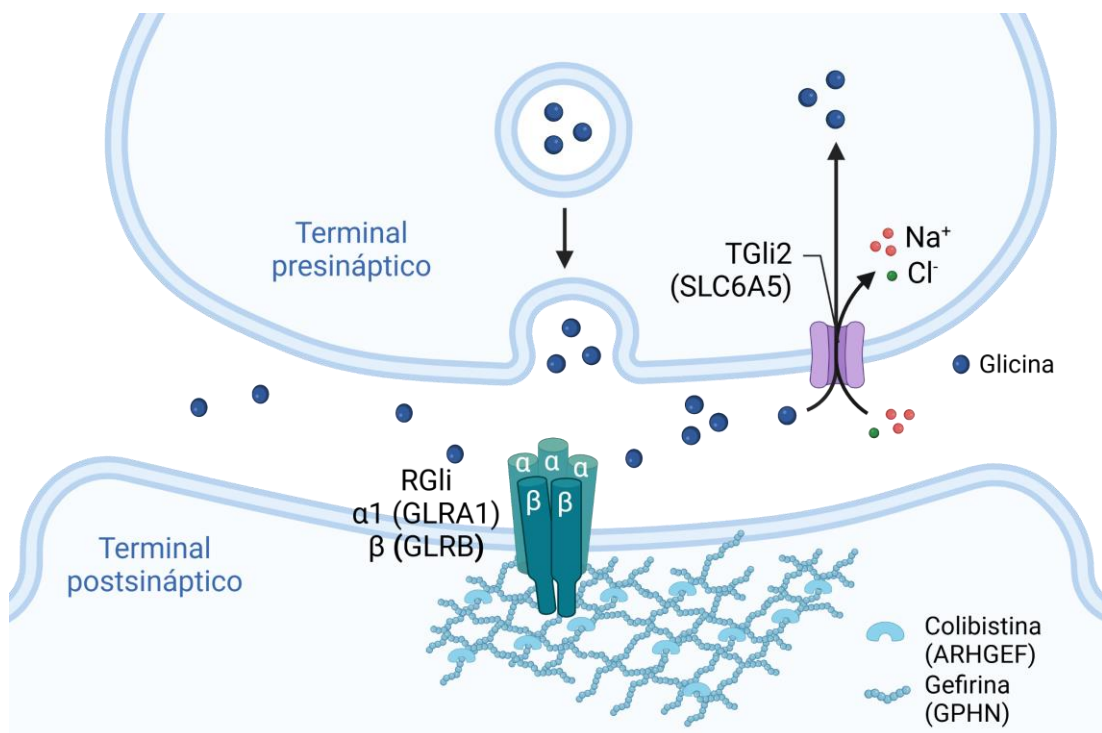
### **Generalidades de la patología Hiperekplexia**

La Hiperekplexia es una enfermedad neurológica rara que se caracteriza por una respuesta de sobresalto exagerada y una rigidez muscular severa que puede ser generalizada o presentarse de manera intermitente<sup>1,2</sup>. Durante estos episodios, a diferencia de las crisis epilépticas, las personas afectadas que presentan la enfermedad experimentan convulsiones no epilépticas, ya que no se produce pérdida de la conciencia<sup>3</sup>. Fue descrita por primera vez en 1958 por Kirstein y Silfverskiöld, quienes identificaron una serie de casos dentro de una misma familia, en la que los individuos afectados sufrían caídas repentinas en respuesta a estímulos emocionales<sup>4</sup>. Posteriormente, en 1966 los autores Suhren y colaboradores identificaron casos adicionales con características similares, dando el término "Hiperekplexia" para referirse a este trastorno<sup>5</sup>.

El conocimiento sobre las mutaciones genética de la Hiperekplexia avanzó de manera significativa en 1993, cuando Shiang y colegas descubrieron que mutaciones en el gen GLRA1, que codifica la subunidad alfa-1 del receptor de glicina, eran responsables de la mayoría de los casos de Hiperekplexia hereditaria<sup>6</sup>. Este hallazgo fue la primera sinaptopatía hereditaria causada por

un receptor defectuoso de neurotransmisores, estableciendo así una nueva categoría de trastornos neurológicos<sup>6</sup>.

Se han identificado cinco genes como responsables de la Hiperekplexia hereditaria: GLRA1, SLC6A5 (TGli2), GLRB (RGli $\beta$ ), GPHN (Gefirina) y ARHGEF (Colibistina) (Figura 1). Estos genes están estrechamente vinculados al sistema de neurotransmisión glicinérgica<sup>7,8</sup>.



**Figura 1:** Proteínas sinápticas implicadas en la enfermedad de Hiperekplexia. Las mutaciones más comunes afectan a los genes GLRA1, SLC6A5 y GLRB (Adaptado de Termsarasab et al., 2020).

## Generalidades del Receptor de glicina

Los receptores de glicina (RGlis) pertenecen a la familia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando, que incluye a los receptores GABA tipo A (RGABA<sub>A</sub>), los receptores nicotínicos de acetilcolina y los receptores de serotonina tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>)<sup>9,10</sup>. Estos receptores de glicina están conformados por un complejo funcional de cinco subunidades que forman un poro central permeable a iones cloruro<sup>10</sup>.

La sinapsis glicinérgica se inicia en el terminal presináptico, donde se almacenan vesículas cargadas con glicina<sup>11,12</sup>. Estas vesículas son llenadas por el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT), que capta glicina de la reserva circulante<sup>11</sup>. Durante la neurotransmisión, las vesículas cargadas liberan glicina en el espacio sináptico a través de un proceso de exocitosis<sup>12</sup>. Una vez liberada, la glicina se une a los receptores de glicina (RGLi) presentes en el terminal postsináptico<sup>12</sup>. Los RGLi pueden ser de dos tipos funcionales:

- Receptores sinápticos: Median corrientes fásicas rápidas y transitorias en respuesta a estímulos sinápticos directos<sup>13</sup>.
- Receptores extrasinápticos: Regulan corrientes tónicas prolongadas, contribuyendo al control basal de la inhibición neuronal<sup>13</sup>.

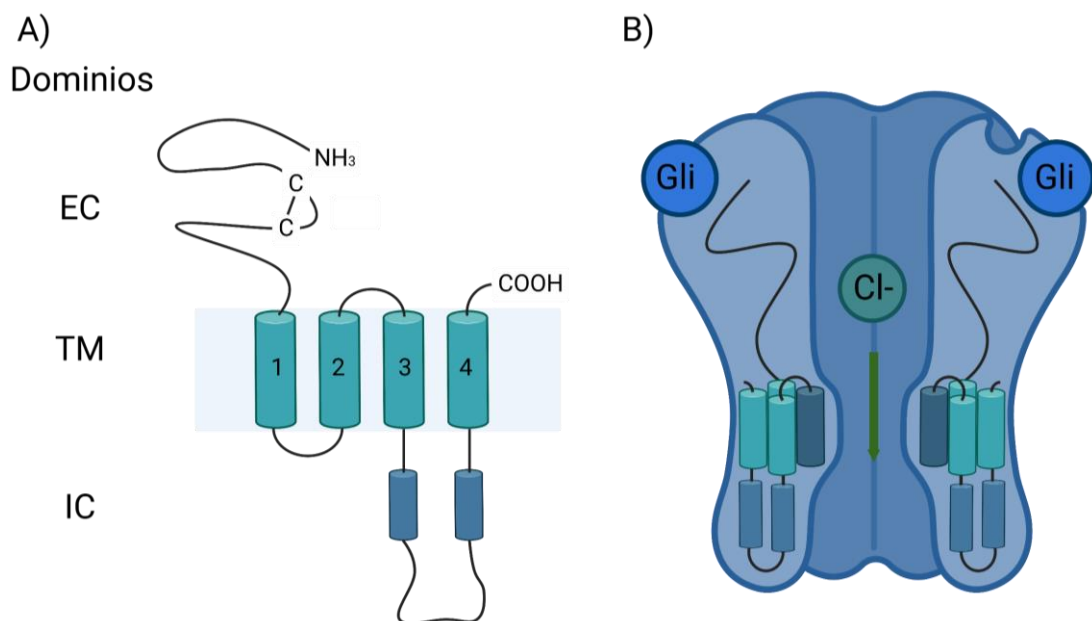
Cuando la glicina es liberada de la neurona presináptica al espacio sináptico, se une a su sitio ortostérico en el RGli que se encuentra en la membrana postsináptica, se desencadena un cambio conformacional que expande el poro central, permitiendo el flujo de cloruro a favor de su gradiente electroquímico<sup>10,12</sup>. Este proceso hiperpolariza la membrana celular de la neurona postsináptica, disminuyendo la excitabilidad neuronal y regulando la actividad de la red neuronal<sup>10,12</sup>.

Hasta la fecha, se han descrito cuatro subunidades alfa ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ), las cuales contienen el sitio de unión al ligando, y una subunidad beta ( $\beta$ ) que permite el anclaje a proteínas del citoesqueleto de la neurona<sup>12,14,15</sup>. El complejo pentamérico puede formarse exclusivamente por subunidades alfa (receptores homoméricos) o por una combinación de subunidades alfa y beta, con una estequiometría de 4:1 o 3:2 (receptores heteroméricos). Estas configuraciones estructurales permiten una diversidad funcional que es crucial para la regulación de la neurotransmisión inhibitoria<sup>14,15</sup>.

Cada subunidad del RGli está formada por varias regiones estructurales clave (Figura 2A): un dominio extracelular (ECD) en el extremo N-terminal, cuatro dominios transmembrana (TM1-TM4), un bucle intracelular (IL) que conecta los dominios TM3 y TM4, y un extremo extracelular en el extremo C-

terminal<sup>12,16-19</sup>. Estas regiones permiten la funcionalidad del receptor en respuesta a la unión de glicina<sup>16,17</sup>.

La activación del RGli se produce cuando la glicina se une a su sitio específico en el dominio extracelular, lo que desencadena una serie de cambios conformacionales<sup>11,19</sup>. Durante este proceso, la parte superior del ECD rota alrededor del eje central del poro del canal, mientras que la parte inferior se inclina hacia el centro de este<sup>11,20</sup>. Este movimiento provoca una reorientación de la región TM2, que constituye el poro iónico<sup>11,20</sup>. La rotación de TM2 permite la apertura del canal, facilitando el paso de iones a través de la membrana celular (Figura 2B)<sup>11</sup>.

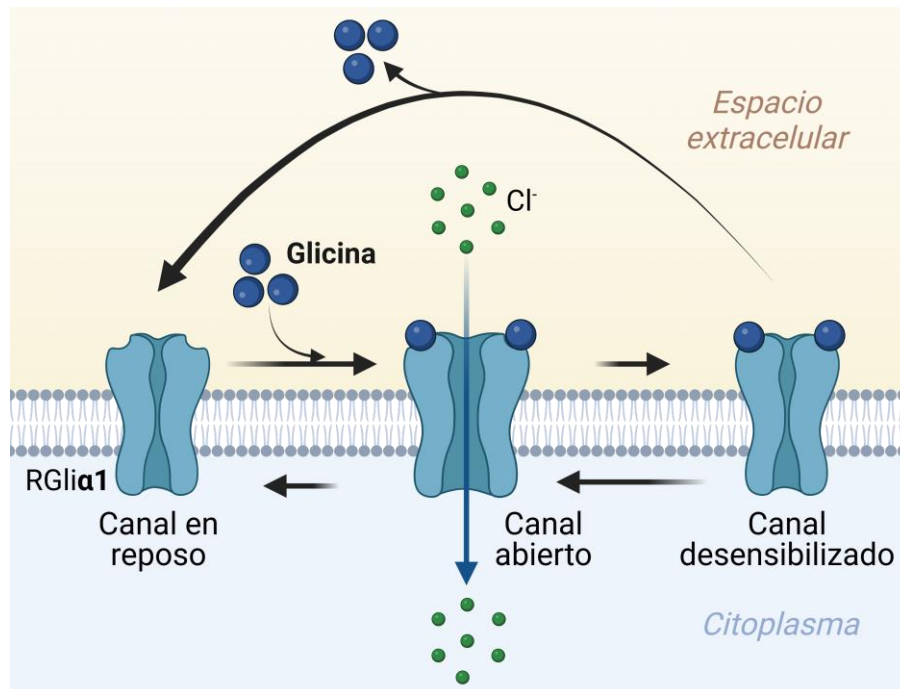


**Figura 2:** Topología y estructura de la familia de canales iónicos dependientes de ligando. A) Representación esquemática de la topología del receptor que muestra el dominio N-terminal, cuatro alfa hélice transmembranal y un Cys-loop con residuos de cisteína que participan en la formación de un puente de

disulfuro. B) Esquema del RGLi que muestra la disposición de las subunidades y alfa hélices para formar un poro iónico central. (Adaptado de Choudhary et al. 2022).

El receptor de glicina experimenta tres estados conformacionales principales durante su ciclo funcional (Figura 3)<sup>19,20</sup>:

- Estado cerrado: En este estado de reposo, el receptor se encuentra inactivo y el poro del canal permanece cerrado impidiendo el paso de iones cloruro<sup>19</sup>.
- Estado abierto: Tras la unión de la glicina al receptor, se producen cambios conformacionales que expanden el poro, permitiendo el flujo de iones cloruro hacia el interior de la neurona. Este estado es responsable de la función inhibitoria del receptor<sup>19,20</sup>.
- Estado desensibilizado: A pesar de que el neurotransmisor sigue unido al receptor, el canal regresa a un estado cerrado. Este mecanismo de desensibilización limita la actividad continua del receptor, protegiendo la célula de una estimulación excesiva<sup>19,20</sup>.



**Figura 3:** Esquema de las conformaciones espaciales del RGl $\alpha$ 1 que implica transiciones en un estado en reposo y conformaciones unidas a glicina como el estado abierto (permite el paso de iones cloruro) y desensibilizado (el poro se encuentra cerrado) (Adaptado de Kumar et al., 2022).

### **Mutación en el Receptor de Glicina Alfa 1 (RGl $\alpha$ 1)**

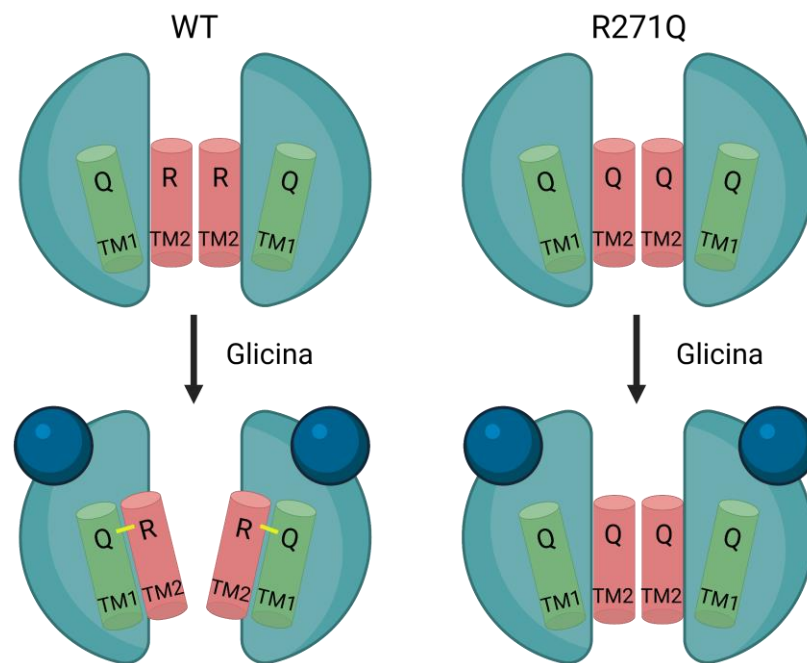
Un componente estructural clave para la transmisión de las señales de unión de glicina es el bucle TM1-TM2, que desempeña un papel fundamental en la apertura del canal iónico<sup>12,21-23</sup>. Alteraciones estructurales en este bucle pueden comprometer la activación eficiente del receptor, lo que conduce a una disminución en la sensibilidad a la glicina y a una reducción en la probabilidad máxima de apertura del canal<sup>12,21,22</sup>. Estas disfunciones

estructurales y funcionales subyacen en las manifestaciones clínicas de la hiperekplexia, destacando la importancia de este dominio en la regulación de la actividad inhibitoria neuronal<sup>12,21,23</sup>.

La enfermedad de Hiperekplexia está estrechamente relacionada con mutaciones en el gen GLRA1, el cual presenta un patrón de herencia que puede ser tanto dominante como recesivo<sup>21,23,24</sup>. Una de las mutaciones más estudiadas y frecuentes en la subunidad  $\alpha 1$  del receptor de glicina (RGli $\alpha 1$ ) es la R271Q, que implica la sustitución de una arginina en la posición 271 por una glutamina<sup>12,24,25</sup>. Esta mutación se localiza en el extremo extracelular del dominio TM2, una región crucial para la funcionalidad del receptor<sup>12</sup>.

Las mutaciones que se encuentran en el extremo de TM2 no afectan la expresión del RGli, pero generan un impacto en la sensibilidad a la glicina y en la conductancia<sup>12,25,26</sup>. La reducción de la conductancia está relacionada con la eliminación de la carga positiva del residuo R271<sup>12,21,27</sup>. En estudios experimentales demostraron que las mutaciones en este sitio provocan los cambios en la afinidad del agonista (glicina) y sus agonistas parciales ( $\beta$ -alanina y la taurina), afectando la magnitud de las corrientes máximas generadas por el receptor<sup>12,25,26</sup>.

Las mutaciones que generan una disminución de la actividad del RGl $\alpha$ 1, afectando la apertura del canal, explicarían los síntomas clínicos observados en la enfermedad de Hiperekplexia<sup>12,23,26,28</sup>. Se plantea que las mutaciones en R271Q generan una interrupción en el puente de hidrogeno con el residuo Q266<sup>12,21,23,27</sup>(Figura 4). Esta interrupción afecta a la capacidad del poro para expandirse y mantenerse estable en su estado conformacional abierto, disminuyendo el flujo de iones cloruro a través del RGl $\alpha$ 1<sup>12,21,23</sup>.



**Figura 4:** Cambios conformacionales del receptor de glicina asociados a la interacción Q226-R271 y su mutación R271Q. La figura muestra el puente de hidrogeno (línea amarilla) formado entre los residuos Q226 (TM1) y R271 (TM2) en la proteína tipo WT. En la variante mutante, esta interacción no se

estabiliza, lo que sugiere una posible alteración estructural en la región transmembranal (Adaptado de Bode et al. 2014).

Como resultado, se produce una desinhibición de las neuronas motoras, que se traduce en un aumento de su actividad de disparo y en contracciones musculares más intensas<sup>12,23</sup>. Este mecanismo es fundamental para comprender las manifestaciones clínicas de la Hiperekplexia, ya que destaca el impacto funcional de estas mutaciones en el RGLi.

### **Tratamientos actuales para Hiperekplexia**

Los síntomas de sobresalto son característicos de la enfermedad de Hiperekplexia y ocurre por una debilitación del sistema inhibitorio glicinérgico, el cual impide amortiguar la actividad excitatoria excesiva que presentan las neuronas motoras<sup>12,28</sup>. Los pacientes que presentan esta condición logran desarrollar mecanismos compensatorios para poder contrarrestar el nivel elevado en la excitación neuronal y mantener el control motor en normalidad, pero estos mecanismos no son capaces de compensar completamente el déficit en la neurotransmisión inhibitoria glicinérgica<sup>25,26</sup>.

En los modelos de Hiperekplexia en ratones, se logró identificar un mecanismo compensatorio mediada por el aumento de la neurotransmisión

inhibitoria gabaérgica<sup>28,29</sup>. Este mecanismo intenta equilibrar la actividad neuronal mediante el aumento en la inhibición sináptica de los RGABA<sub>A</sub><sup>29</sup>.

En la actualidad, no hay medicamentos aprobados que sean selectivos a los RGl<sub>i</sub> mutante. El único medicamento aprobado para el tratamiento de la Hiperekplexia es el Clonazepam, es un modulador alostérico positivo de los RGABA<sub>A</sub><sup>12,23</sup>. Este fármaco logra mejorar la función inhibitoria gabaérgica ayudando a controlar los síntomas al potenciar la acción de los RGABA<sub>A</sub>, restaurando parcialmente la excitación de las neuronas motoras<sup>12</sup>.

En este contexto, es relevante explorar nuevas estrategias que actúen en el RGl<sub>i</sub>. El propofol, un anestésico general intravenoso, ha demostrado ser capaz de restaurar la función del RGl $\alpha$ 1 disfuncional portador de la mutación R271Q en modelos *in vitro* e *in vivo*<sup>26</sup>. En modelos de ratón con esta misma mutación, el propofol logró normalizar los síntomas de la enfermedad destacando su potencial terapéutico, pero sin el efecto anestésico<sup>26</sup>.

En los estudios de mutagénesis se identificó que el propofol se une a un sitio específico del receptor formado por los residuos S267 (en TM2) y A288 (en TM3)<sup>30,31</sup>. El sitio de unión en donde se encuentran estos residuos es cercano al residuo R271, los resultados sugieren que la interacción del propofol en esta región influye indirectamente en el mecanismo de activación por el residuo R271 restaurando parcialmente la funcionalidad del receptor<sup>25,30</sup>. Este

hallazgo abre la posibilidad de diseñar moléculas más selectivas al sitio de unión de los anestésicos generales del RGlir1 para lograr un efecto terapéutico similar.

### **Importancia de las herramientas computacionales**

En los últimos años, las herramientas computacionales han logrado desempeñar un papel crucial en el diseño *de novo* y en el Cribado Virtual (CV) de compuestos bioactivos, debido a su capacidad de optimizar y disminuir significativamente el proceso de descubrimiento de nuevas moléculas con potencial farmacológico.

La búsqueda de nuevos fármacos se apoya en la información bioquímica, molecular y estructural, tanto de la proteína como de los ligandos, permitiéndonos incrementar significativamente las probabilidades de éxito en el descubrimiento de moléculas efectivas<sup>32,33</sup>. Los métodos computacionales desempeñan un papel clave en estas estrategias, debido a que integran y analizan los datos químicos y biológicos sobre la conformación bioactiva de los ligandos y los residuos que conforman el sitio de unión de la proteína<sup>32</sup>. Este enfoque, nos permite identificar y optimizar compuestos candidatos de manera más eficiente reduciendo en el tiempo y recursos necesarios para encontrar compuestos bioactivos<sup>32,33</sup>.

El diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) facilita la implementación de estrategias racionales basada en la información estructural de la proteína y los ligandos<sup>32</sup>. Sin embargo, estos métodos computacionales presentan limitantes, por lo tanto, se necesita la validación de la actividad de las moléculas identificadas mediante ensayos experimentales. El DIFAC comprende una amplia gama de métodos computacionales, algunas de ellas son el diseño *de novo*, CV, *docking* molecular, MM-GBSA y Dinámicas Moleculares (DMs)<sup>33</sup>. El DIFAC se puede clasificar en 2 métodos basados en la estructura y basado en ligandos<sup>34</sup>.

### **I. Basados en la estructura (SBDD)**

Los métodos DIFAC que están basado en la estructura son los más utilizados, ya que depende de la estructura de la proteína objetivo<sup>32</sup>. Este método selecciona los principales compuestos de un amplio espacio químico que mejor se adapte a la estructura del objetivo determinado<sup>32</sup>. El uso de herramientas computacionales y la realización de evaluaciones de las propiedades ADMET, nos permite acelerar el proceso del desarrollo de fármacos<sup>32,35</sup>. El método SBDD logra incorporar técnicas como la química y cálculos predictivos con el objetivo de generar compuestos candidatos a fármacos que son optimizados para los ensayos experimentales<sup>36,37</sup>.

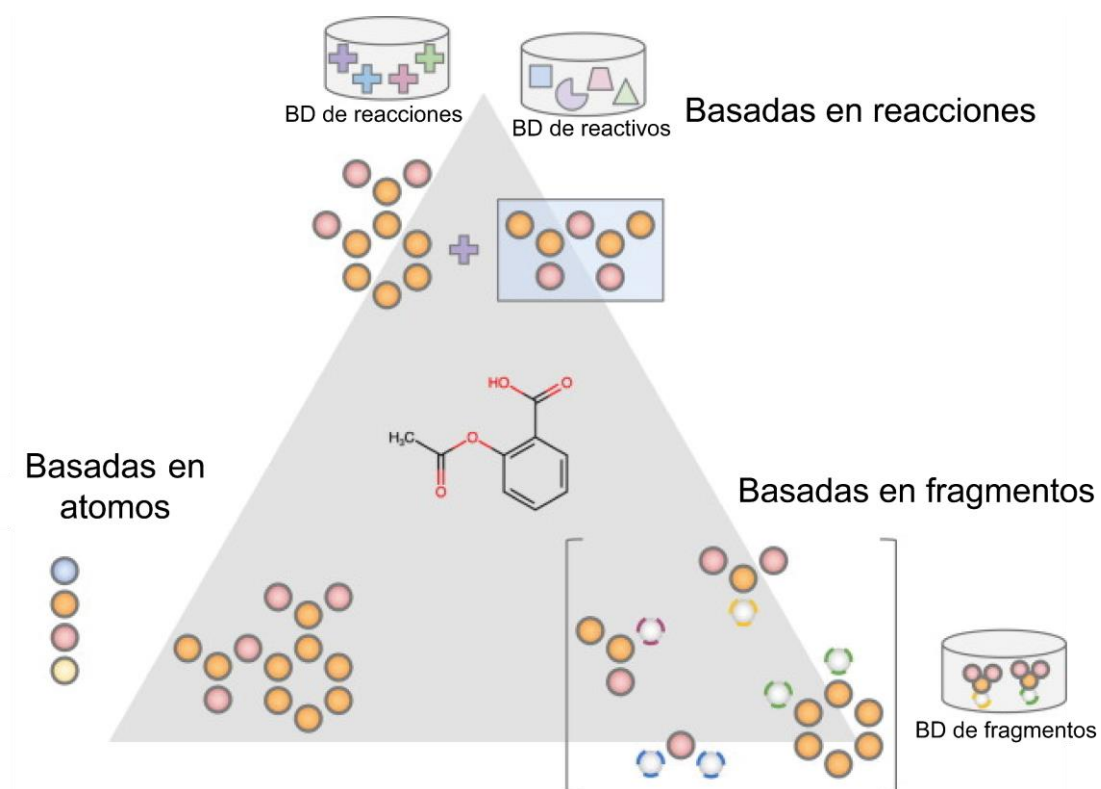
El enfoque de SBDD ha sido ampliamente utilizado en la investigación académica y en la industria farmacéutica debido a su comprobada eficiencia. Este método permite una planificación racional de compuestos bioactivos, optimizando tanto el tiempo como los recursos necesarios para el desarrollo de nuevos medicamentos<sup>36</sup>. Uno de los primeros casos de éxito fue el diseño de inhibidores contra el VIH-1 aprobados por la FDA<sup>38</sup>. Posteriormente, este enfoque también permitió el desarrollo de fármacos como raltitrexed, el antibiótico norfloxacin, amprenavir e isoniazida, entre otros<sup>36</sup>. El SBDD integra herramientas como el diseño *de novo* y CV, consolidándose como una estrategia robusta en el descubrimiento de compuestos terapéuticos<sup>36</sup>.

#### a. Diseño *de novo*

El diseño *de novo* de moléculas nos permite generar estructuras químicas que son novedosas de forma automática<sup>35,37</sup>. Estas moléculas son diseñadas para que logren cumplir con perfiles moleculares específicos, como la actividad biológica y propiedades aceptables<sup>37</sup>. El diseño de moléculas *de novo* se basa en 3 enfoques (Figura 5)<sup>37</sup>:

- Basadas en átomos: Nos permite explorar el espacio químico de forma detallada y exhaustiva, diseñando moléculas nuevas al añadir o modificar átomos uno por uno<sup>35,37</sup>.

- Basadas en fragmentos: Las moléculas son divididas en subestructuras conocidas que se combinan para lograr generar nuevos compuestos<sup>35,37</sup>.
- Basadas en reacciones: Realiza reacciones químicas *in silico* que simulan procesos de síntesis orgánicas definidas sobre compuestos iniciales<sup>37</sup>.



**Figura 5:** Representación molecular basados en átomos, fragmentos y reacciones para la aspirina (Adquirido y adaptado de Meyers et al. 2021).

b. Cribado virtual

El CV se complementa con herramientas como *docking* molecular y cálculos de energía libre de unión para refinar los resultados y seleccionar los mejores candidatos. Además, herramientas como ADMET evalúan propiedades farmacocinéticas y toxicidad, descartando compuestos no viables antes de las pruebas experimentales. Este enfoque no solo reduce significativamente los costos y tiempos, sino que también permite explorar millones de compuestos de manera rápida y precisa, identificando candidatos innovadores para estudios experimentales.

## **II. Métodos basados en ligandos (LBVS)**

La técnica LBVS se fundamenta en la identificación de compuestos con similitudes estructurales y químicas respecto a moléculas con actividad biológica conocida. Este enfoque es particularmente útil cuando no se dispone de la estructura tridimensional del blanco molecular, permitiendo seleccionar candidatos potenciales en función de su parecido con ligandos previamente caracterizados que han demostrado eficacia en determinadas aplicaciones terapéuticas<sup>34</sup>. Se emplean métricas como índice de Tanimoto, el análisis de farmacóforos y la QSAR.

Existen 3 métodos principales en LBVS:

- Búsqueda por similitud molecular: Se utilizan algoritmos de comparación estructural para evaluar el grado de semejanza entre los compuestos de una BD y un ligando de referencia.
- Modelado farmacofórico: Se identifican patrones de interacciones claves entre ligandos y su blanco terapéutico, permitiendo la selección de compuestos con características compatibles con la actividad deseada.
- Método QSAR: Se generan modelos matemáticos que correlacionan las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los compuestos con su actividad biológica. Se recopilan compuestos químicos con actividades biológicas conocidas, y estos compuestos se utilizan para el entrenamiento y la evaluación del modelo.

### **Importancia de la validación experimental**

La validación experimental mediante técnicas electrofisiológicas es fundamental en investigaciones relacionadas con receptores iónicos y neurotransmisores, especialmente cuando se desarrollan moduladores específicos. Estas técnicas permiten medir directamente y en tiempo real la funcionalidad de los canales iónicos y su interacción con las moléculas diseñadas, proporcionando evidencia experimental que respalde la eficacia de los compuestos.

La electrofisiología permite evaluar parámetros clave como la afinidad (EC50/IC50), potencia, eficacia y cinética de los compuestos, proporcionando una caracterización de su actividad farmacológica. Este tipo de validación es particularmente importante en estudios dirigidos a receptores con mutaciones específicas, como GlyR $\alpha$ 1 con la mutación R271Q, donde el registro de corrientes iónicas permite determinar si los compuestos diseñados pueden restaurar la funcionalidad alterada del receptor. Además, técnicas como el registro en modalidad de célula completa permiten evaluar los efectos de los compuestos en un entorno controlado, utilizando células que expresan el receptor de interés. Esto asegura que los resultados obtenidos sean directamente atribuibles a la interacción entre el receptor y el ligando, eliminando variables externas que puedan interferir.

Por otro lado, los datos obtenidos mediante electrofisiología no solo confirman las predicciones computacionales realizadas previamente, sino que también permiten optimizar los compuestos diseñados. Con esta información, es posible ajustar sus propiedades estructurales para mejorar su afinidad, selectividad y eficacia, incrementando su potencial como candidatos terapéuticos. En resumen, la validación mediante electrofisiología es un paso crucial para garantizar la calidad y funcionalidad de los resultados en proyectos dirigidos al desarrollo de nuevos moduladores, contribuyendo de manera decisiva a la generación de terapias específicas y efectivas.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Los avances en el uso de herramientas computacionales han demostrado ser de gran utilidad en la identificación de nuevas moléculas con potencial terapéutico, permitiendo optimizar tanto los tiempos como los costos del proceso de descubrimiento de fármacos. Esta aproximación resulta especialmente valiosa en patologías poco estudiadas como la hiperekplexia, donde las opciones de tratamiento disponibles son escasas y no específicas. En este contexto, la posibilidad de encontrar moléculas capaces de modular de manera efectiva al RGl $\alpha$ 1 mutante representa una alternativa prometedora para restaurar la neurotransmisión inhibitoria alterada y con ello, mejorar el control de la excitabilidad neuronal que se encuentra comprometida en esta enfermedad.

### **Hipótesis**

Moduladores alostéricos diseñados sobre el sitio de unión del propofol en el RGl $\alpha$ 1 mutante disfuncional (R271Q) reestablecen su actividad.

## **Objetivo general**

Diseñar moléculas que se unan al sitio teórico del Propofol en el RGl $\alpha$ 1 y evaluar su impacto en la función del receptor silvestre (WT) y su mutante hiperekplexica (R271Q).

## **Objetivos específicos (OE)**

OE1. Identificación del sitio susceptible de modulación de la actividad de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).

OE2. Diseño de moléculas asistido por computador que se unan al potencial sitio de unión de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).

OE3. Cribado virtual de moléculas disponibles en bases de datos comerciales.

OE4. Caracterización farmacológica de las moléculas con resultados más promisorios, mediante electrofisiología.

## **METODOLOGÍA**

### **OE1. Identificación del sitio susceptible de modulación de la actividad de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).**

#### **OE1.A1. Selección de la proteína cristalizada**

En la selección de la proteína cristalizada, se realizó una búsqueda en la base de datos PDB para identificar estructuras cristalográficas del RGl $\alpha$ 1 homopentamérico en su estado conformacional abierto y cerrado de origen humano. En el caso de no encontrar una estructura cristalizada de origen humana, se estableció como criterio adicional seleccionar un cristal de otra especie que presente un porcentaje de identidad cercano al 100%. La evaluación del porcentaje de identidad se realizó con un análisis de homología utilizando el servidor web BLAST, el cual nos permite calcular la similitud de proteínas a través de su secuencia.

Con las proteínas de un estado conformacional cerrado y abierto del RGl $\alpha$ 1, se caracterizó en el poro de la proteína utilizando la herramienta HOLE<sup>39</sup> en VMD<sup>40</sup>, la cual permite el análisis y visualización de las dimensiones de los poros que atraviesan las estructuras moleculares de los canales iónicos<sup>41</sup>.

Este análisis permite identificar los aminoácidos responsables de formar el canal y determinar el diámetro que tiene el poro para la selección del estado conformacional abierto, que presenta un mayor diámetro de poro que la conformación cerrada.

### **OE1. A2. Identificación del sitio de unión del Propofol**

Con la proteína cristalizada del RGl $\alpha$ 1 en su conformación abierta previamente seleccionada (OE1.A1), se utilizó la herramienta Mutate Residue<sup>42</sup> de la suite Maestro<sup>43</sup> para realizar la mutación del residuo 271 de una arginina por una glutamina<sup>44</sup>. Posteriormente, a la proteína mutada se le realizó una minimización energética con un radio de 10Å alrededor del aminoácido mutado, utilizando el software Maestro<sup>43</sup>. Esta minimización se efectuó en ausencia de solvente, ya que se utilizó la configuración por defecto.

Con RGl $\alpha$ 1 R271Q se identificaron todas las cavidades presentes en su estructura tridimensional. Para este propósito, se utilizó el servidor web Fpocket<sup>45</sup>, especializado para la identificación de cavidades en proteínas, permitiéndonos un mapeo detallado de las cavidades disponibles<sup>46</sup>. Se selecciona la cavidad que presentó los aminoácidos S267, A288 y R271Q, debido a que en estudios previos han demostrado mediante experimentos de mutagénesis que las mutaciones en S267 y A288 generan una disminución significativa en la afinidad del Propofol hacia el receptor<sup>30,31</sup>.

La molécula de Propofol se preparó utilizando la herramienta LigPrep<sup>47</sup>, en donde su estado de ionización es asignado con Epik a un pH de  $7.4 \pm 0.2$  y generar la estructura de la molécula a tridimensional. El RGl $\alpha$ 1 R271Q se preparó con Protein Preparation Wizard<sup>47</sup> de Maestro, el cual incluyó los pasos de preprocesamiento, optimización, eliminación de aguas y minimización. Durante el preprocesamiento, se corrigieron los defectos estructurales completando la información faltante a un pH de  $7,4 \pm 0.2$ <sup>47</sup>. En la optimización, se asignaron los hidrógenos y cambia los estados de protonación de los residuos y ligandos (glicina) a un pH  $7.4$ <sup>47,48</sup>. Se eliminaron las moléculas de aguas y se realizó una minimización energética con un RMSD de  $0,3 \text{ \AA}$  para la corrección de conflictos que pueden ocurrir al agregar los hidrógenos y completar las cadenas laterales faltantes<sup>47</sup>.

Luego, se llevó a cabo un *docking* molecular mediante la herramienta Glide<sup>43</sup>, el cual se construyó una grilla cubica abarcando la totalidad de la cavidad seleccionada. Las dimensiones de la grilla interna son  $12x \times 12y \times 12z \text{ \AA}^3$  considerando que sea lo suficiente grande para que el Propofol rote sin restricciones, mientras que las dimensiones de la grilla externa son  $26x \times 26y \times 26z \text{ \AA}^3$ . El *docking* molecular se realizó en la región transmembranal de las 5 interfaces entre las 5 subunidades contiguas del receptor con un nivel de precisión estándar (SP) y se generaron 10 poses por cada una de ellas, las cuales fueron sometidas a cálculos de energía libre de unión utilizando el

método MM-GBSA con Prime<sup>43</sup>. Se seleccionó la pose que presentó un  $\Delta G_{\text{bind}}$  más negativo, la cual nos indica una interacción más estable del complejo proteína-ligando.

El complejo proteína-ligando se sometió a MDs utilizando el software Desmond de la suite Maestro. El complejo que contiene RGl $\alpha$ 1 R271Q con el Propofol fue integrado en una membrana de POPC, solvatado con el modelo de agua SPC, con una concentración de NaCl de 0.15M y el sistema fue neutralizado con 5 iones de Cl<sup>-</sup>. Las MDs se realizaron bajo condiciones de ensamble NPT con el campo de fuerza OPLS4 con temperatura constante de 300K y la presión a 1.01325 bar. Las MDs iniciaron con un equilibrado de 20 ns aplicando restricciones de 10 kcal/(mol $\times$ Å<sup>2</sup>) al *backbone* y al Propofol. Posteriormente, se llevó a cabo 3 réplicas de MDs de producción con una duración de 500 ns utilizando las mismas condiciones, pero sin restricciones energéticas. Este enfoque nos permitió determinar la fuerza de la interacción y la afinidad de unión de un ligando por un receptor. Se analizaron las interacciones proteína-ligando con PLIP (*Protein-Ligand Interaction Profiler*)<sup>49</sup>. Se realizó el análisis general del complejo proteína-ligando de manera automatizada con *Simulation Interactions Diagram*<sup>50</sup> de Maestro y se graficó con el software *Prism*<sup>51</sup>. En los gráficos de frecuencia de interacción, la molécula del Propofol se dividió en 3 fragmentos: R1 que corresponde al primer grupo isopropilo, R2 que corresponde al segundo grupo isopropilo y el core identificado como un fenol. El fragmento que presente la mayor cantidad

de interacciones frecuentes y los enlaces más fuertes fué seleccionado como fragmento de partida para el diseño *de novo*.

## **OE2. Diseño de moléculas asistido por computador que se unan al potencial sitio de unión de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).**

### **OE2.A1. Diseño *de novo* de moléculas moduladoras**

Se realizó el diseño *de novo* de las moléculas moduladoras con el servidor web E-LEA3D<sup>52</sup>, que es un conjunto de programas automatizados de diseño molecular *de novo*, el cual está diseñado para crear nuevas moléculas utilizando una biblioteca de fragmentos moleculares y determinando las mejores combinaciones<sup>35,53</sup>. El fragmento de partida será el fragmento seleccionado en OE1.A2.

Las moléculas diseñadas se agruparon en clúster utilizando la herramienta *Clustering Base on Volume Overlap* implementado en la suite de Maestro, el cual clasifica las estructuras moleculares en función de la similitud en sus volúmenes. El cálculo del solapamiento de volumen se configuró con una normalización de los valores de solapamiento, un radio fijo de 1.7 Å y un espaciado de grilla de 1 Å, garantizando un análisis detallado y preciso de la similitud entre las moléculas. Posteriormente, se generó una matriz de solapamiento de volúmenes que sirvió como base para identificar las

relaciones de similitud estructural entre las moléculas. El agrupamiento se realizó utilizando *Linkage method: Average* y se evaluó la calidad del agrupamiento mediante el valor de *Clustering strain*. Una vez calculado los clústeres, las moléculas más cercanas al centroide de cada grupo fueron seleccionadas como representativas.

### **OE3. Cribado virtual de moléculas disponibles en bases de datos comerciales.**

#### **OE3.A1. Detección virtual basada en la forma de las moléculas diseñadas *de novo*.**

Las moléculas representativas se prepararon utilizando la herramienta LigPrep<sup>47</sup> de la suite Maestro, en donde su estado de ionización es asignado con Epik a un pH de  $7.4 \pm 0.2$ . Se llevo a cabo un cribado virtual utilizando las moléculas representativas y una base de datos compuesta por aproximadamente de 14 millones de compuestos comerciales como Enamine, eMolecules, Molport y Vitas-M, la cual fue diseñada por integrantes del laboratorio del Dr. David Ramírez. Se identificaron compuestos con similitud estructural significativa por cada molécula representativa con la herramienta *GPU Shape Screening*<sup>54</sup> de Maestro<sup>43</sup>, este método nos permitió comparar la estructura 3D de las moléculas de la base de datos con las moléculas representativas logrando identificar aquellas con mayor similitud estructural.

Se eligieron las moléculas que presentaron un *score* de similitud mayor a 0.5, ya que este rango asegura una alta correspondencia estructural con las moléculas representativas.

### **OE3.A2. Docking molecular**

Las moléculas elegidas con *Shape Screening* se cribaron mediante *docking* molecular utilizando la herramienta *Glide*<sup>55</sup> de Maestro. En la realización del *docking* molecular se utilizó la RGl $\alpha$ 1 R271Q, con una grilla centrada en el sitio de unión propuesto para el Propofol previamente identificado (OE1.A2), el cual será lo suficiente grande para albergar todo el sitio con dimensiones en la grilla interna 12 Å, 12 Å, 12 Å y con la grilla externa 26 Å, 26 Å, 26 Å.

En el *docking* molecular se usaron precisiones de tipo HTVS (*High-Throughput Virtual Screening*), SP (*Standard Precision*) y XP (*Extra Precision*). El *docking* molecular HTVS es más rápido y menos exhaustivo que SP, debido a que reduce la cantidad de conformeros y el refinamiento torsional final. El SP proporciona un equilibrio entre precisión y tiempo de cómputo. El XP realiza un muestreo más detallado que SP y emplea una función de puntuación más rigurosa con la eliminación de falsos positivos y exigiendo una mayor complementariedad entre el ligando y el receptor. En las corridas de *docking* molecular, se generó una pose por ligando y se eligieron los compuestos en el HTVS con un 20% de mejor *docking score*, después con el

SP se eligen los que presentan el 20% con mejor *docking score* y con el *docking* molecular XP se eligieron el 50% de las moléculas con mejor *docking score*.

### **OE3.A3. Post-procesamiento de resultados de *docking* mediante predicción de energía libre de unión.**

Los cálculos de MM-GBSA se realizaron utilizando la herramienta *Prime* de la suite Maestro<sup>56</sup>. Este tipo de análisis se aplicó a las moléculas seleccionadas del *docking* molecular de tipo XP (OE3.A3), con el objetivo de evaluar su afinidad hacia el receptor. La selección final de las moléculas se basó en aquellas que presentaron un valor de  $\Delta G_{\text{bind}}$  menor al obtenido en el Propofol, indicando una mayor estabilidad en su interacción con el sitio de unión.

### **OE3.A4. Predicción de las propiedades ADMET**

Las moléculas seleccionadas fueron evaluadas mediante el servidor web SwissADME<sup>57</sup> para la predicción de propiedades farmacocinéticas y el análisis se enfocó principalmente en la permeabilidad de la BHE y la solubilidad acuosa. La permeabilidad de la BHE fue priorizada debido a que los RGl $\alpha$ 1 se encuentran principalmente en la medula espinal, por lo es esencial que los compuestos puedan atravesar esta barrera para alcanzar el sitio de unión. Asimismo, se consideró que las moléculas sean solubles en solución acuosa, ya que esta característica es indispensable para la preparación de las soluciones experimentales. A las moléculas obtenidas se le realizó un análisis

del valor de *Quantitative Estimate of Drug-likeness* (QED) que nos permite evaluar sus propiedades farmacocinéticas con la compatibilidad con características de fármacos aprobados<sup>58</sup>. Aquellos compuestos con valores de QED más cercanos a 1 presentan una mayor probabilidad de ser viables como candidatos a fármacos, mientras que los valores cercanos a 0 pueden estar asociados con toxicidad<sup>58</sup>.

#### **OE4. Caracterización farmacológica de las moléculas con resultados más promisorios, mediante electrofisiología.**

##### **OE4.A1. Cultivo celular**

Se utilizaron células HEK293, las cuales fueron cultivadas y sembradas en vidrios de 18 mm con medio D-MEM y FBS al 10% en una incubadora termo regulada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

##### **OE4.A2. Transfección**

La transfección se llevó a cabo utilizando Lipofectamina 2000 de Invitrogen, empleando una proporción de 700 ng de DNA para RGl $\alpha$ 1 y RGl $\alpha$ 1 R271Q. Además, se utilizó el plásmido GFP (proteína verde fluorescente) en una proporción de 300 ng para confirmar la expresión eficiente de los plásmidos de RGl $\alpha$ 1 y RGl $\alpha$ 1 R271Q. Los plásmidos se diluyeron en Opti-MEM (Gibco™) y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, después se

agregó mediante goteo suave sobre las células en una confluencia de 50-60%, se mantuvieron las células con el medio y condiciones de cultivos descrito anteriormente por 16 a 24 horas.

Los plásmidos utilizados en el proyecto son los siguientes (gen/vector): GFP/pGreenLatern, RGl $\alpha$ 1/pcDNA3 y RGl $\alpha$ 1R271Q/pcDNA3 todos disponible en el laboratorio.

#### **OE4.A3. Preparación de las soluciones y pipetas**

La solución externa está compuesta por NaCl 150mM, KCl 5.4mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM, se ajustó con pH 7.4 y a una osmolaridad entre 320-330 mOsm, almacenándose a 4°C hasta el momento de utilización. La solución interna está compuesta por CsCl 14mM, MgCl 2mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, EGTA 10mM y HEPES 10mM, la cual se ajustó a pH 7,4 y 290-310 mOsm almacenándose a -20 °C. Las pipetas utilizadas para los registros electrofisiológicos se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) mediante un puller vertical (Sutter Instruments P-89, Novato, CA) y se ajustaron con una microforja (MF-830, Narishige, Japón) para obtener una resistencia de 5-6 M  $\Omega$  adecuada para el modo de célula completa.

La solución stock de glicina a 10 mM se preparó utilizando Glicina Hidrocloruro (Sigma) disuelta en agua nano-pura y se almacenó a -20°C hasta su uso. Para los compuestos obtenidos del cribado, se preparó una solución de stock con

una concentración de 50 mM disuelto en DMSO y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En los experimentos de electrofisiología, la cantidad de DMSO no superó el 1% del volumen de la solución. Se prepararon soluciones de trabajo específicas para los ensayos con RGl $\alpha$ 1 y RGl $\alpha$ 1 R271Q. En las soluciones para RGl $\alpha$ 1 se utilizó una solución base de 20  $\mu\text{M}$  de glicina y para RGl $\alpha$ 1 R271Q fue de 500  $\mu\text{M}$ , que fueron preparada mediante solución con solución externa y a partir de estas, se prepararon soluciones que contenían los moduladores en concentraciones 0.5, 5, 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$  los cuales fueron mezclados con la solución base de 20  $\mu\text{M}$  o 500  $\mu\text{M}$  de glicina.

#### **OE4.A4. Registros Electrofisiológico**

Los registros fueron realizados en células HEK293 (células embrionarias de riñón humano 293) en célula completa con Voltage clamp a  $-60\text{ mV}$  a temperatura ambiente. Las pipetas fueron llenadas con solución interna y las células fueron mantenidas en una solución externa. La adquisición y digitalización de los datos electrofisiológicos se realizaron con un amplificador Axopatch 200B, un Digidata 13222A y el programa pClamp 9 (Molecular Devices, USA). El análisis de los registros fue realizado utilizando el programa Clampfit 10 (Molecular Devices, USA). La aplicación de la solución externa, ligando y los moduladores fue realizada mediante perfusión por gravedad.

El efecto del agonista y los moduladores fue evaluado a través del porcentaje de potenciación y la actividad del agonista y otros parámetros farmacológicos fueron calculadas mediante curvas de concentración-respuesta. El porcentaje de potenciación fue calculada usando la ecuación:

$$\text{Potenciación (\%)} = (I_{\text{Modulador}} \times 100) / I_{\text{Agonista}}$$

Donde  $I_{\text{Modulador}}$  es la corriente evocada por el agonista en presencia de una determinada concentración del modulador, e  $I_{\text{Agonista}}$  es la amplitud de la corriente evocada por la concentración del agonista control (EC20). Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 8, los resultados se presentaron como media  $\pm$  SEM y las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante ANOVA.

#### **OE4.A4. Evaluación *in silico* de las moléculas más potenciales a partir de los registros electrofisiológicos.**

Las moléculas que demostraron un efecto prometedor en los registros electrofisiológicos fueron seleccionadas para su evaluación mediante DMs en RGLi $\alpha$ 1 WT y RGLi $\alpha$ 1 R271Q durante 1000 ns. Estos complejos fueron sometidos a DMs utilizando el software Desmond de la suite Maestro. Para la configuración del sistema, los complejos fueron integrados en una membrana de POPC, solvatados con el modelo de agua SPC y se estableció una concentración de NaCl de 0.15 M para mantener condiciones fisiológicas. El

sistema fue neutralizado con 5 iones de Cl<sup>-</sup> y las simulaciones se realizaron bajo un ensamble NPT empleando un campo de fuerza OPLS4, con temperatura constante de 300K y presión de 1 bar.

Las simulaciones se iniciaron con una etapa de equilibrio de 20 ns, aplicando restricciones de 10 kcal/(mol×Å<sup>2</sup>) al *backbone* y a las moléculas. Posteriormente, se llevaron a cabo las simulaciones de producción con una duración de 1000 ns manteniendo las mismas condiciones, pero eliminando las restricciones energéticas. Este enfoque permitió evaluar la fuerza de la interacción y la afinidad de unión de las moléculas con el receptor. Se analizaron las interacciones proteína-ligando, así como la estabilidad estructural de las proteínas y las moléculas a lo largo del tiempo. Para el análisis de la frecuencia de interacciones entre el ligando y los residuos de la cavidad del receptor, se empleó la herramienta PLIP<sup>49</sup> y se realizó el análisis general del complejo proteína-ligando de manera automatizada con Simulation Interactions Diagram<sup>50</sup> de Maestro y se graficó con el software Prism<sup>51</sup>.

## RESULTADOS

### OE1. Identificación del sitio susceptible de modulación de la actividad de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).

#### OE1.A1. Selección de la proteína cristalizada

Se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos PDB para la identificación de estructuras cristalográficas de RGl $\alpha$ 1 R271Q, tanto en su forma homopentamérica como heteropentamérica, pero no se encontraron registros disponibles para ninguna especie. A continuación, se realizó una búsqueda del RGl $\alpha$ 1 homopentamérico de origen humano, la cual se encontró con una estructura quimera en un estado conformacional cerrado y la región transmembranal correspondía a la especie humana. Para ampliar la búsqueda, en la base de datos UniProt se realizó un análisis de homología mediante BLAST, aplicando como filtro que las proteínas identificadas tuvieran una estructura cristalizada disponible

Aunque la estructura cristalina del RGl $\alpha$ 1 de origen humano en un estado conformacional abierto no está disponible, se encontró que el RGl $\alpha$ 1 de origen *Danio rerio* que tiene un porcentaje de identidad del 85.6% y de origen *homo sapiens* del RGl $\alpha$ 3 con un porcentaje de identidad de 81.7% con la secuencia humana optando así para su utilización al del origen *Danio rerio*.

Esta decisión se basó por su alta identidad de secuencia y la disponibilidad de los datos estructurales. Se realizó una búsqueda en UniProt para lograr identificar las estructuras cristalográficas disponibles que estén asociadas al identificador UniProt ID O93430, correspondiente al RGl $\alpha$ 1 de origen *Danio rerio* y en la tabla 2 se detallan las estructuras encontradas junto a sus resoluciones y el estado conformacional abierto.

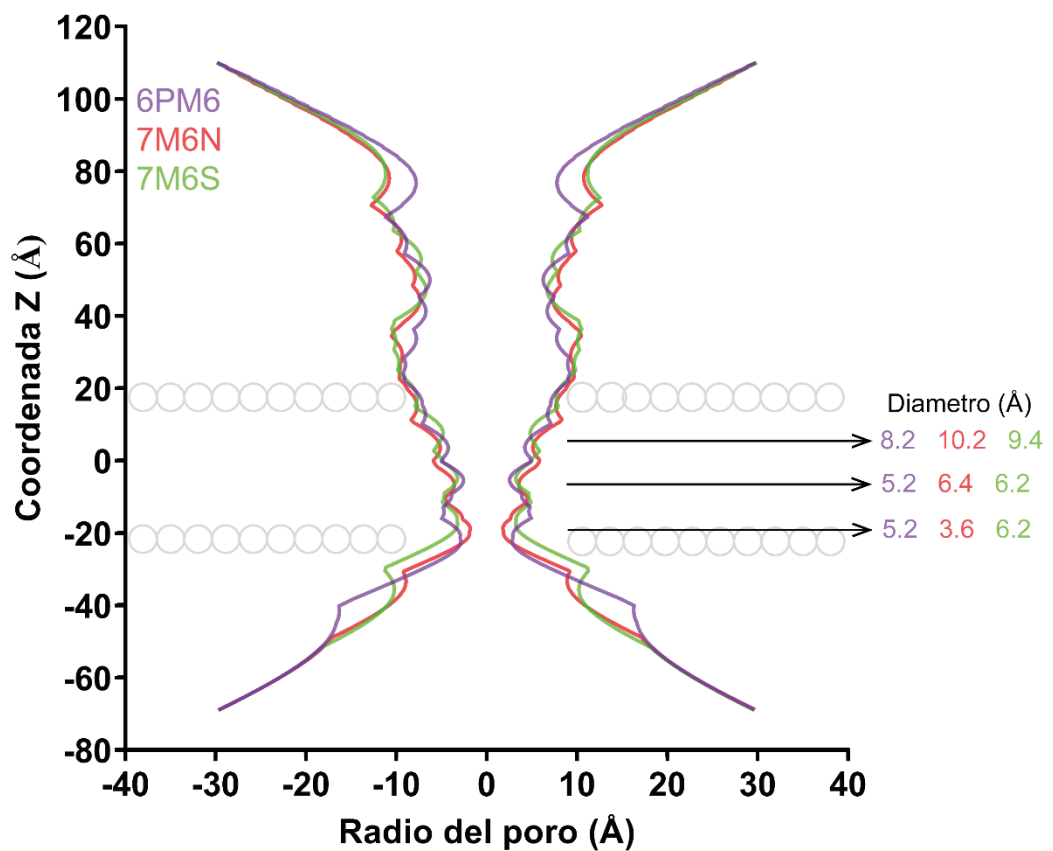
**Tabla 1:** Estructuras cristalográficas del RGl $\alpha$ 1 en estado conformacional abierto de especie *Danio rerio* unido a glicina.

PDB ID	Resolución	Ligandos	Referencia
6PM6	2.90	Glicina y SMA	Yu et al. 2021
7M6S	3.61	Glicina y THC	Kumar et al. 2022
7M6N	2.61	Glicina	Kumar et al. 2022

En la búsqueda de las estructuras del RGl $\alpha$ 1, se seleccionaron aquellas que presentaban una resolución menor a 4 Å y se encontrara la glicina en el sitio ortostérico. Se identificaron 3 estructuras con resoluciones de 2.90, 3.61 y 2.61 Å que corresponden a los PDBs IDs 6PM6, 7M6S y 7M6N, respectivamente. A las estructuras se les realizó un análisis de poro utilizando

la herramienta HOLE, con el objetivo de identificar aquella que presente un poro más amplio, ya que la conformación con el mayor diámetro de poro proporcionará una representación más precisa del estado abierto del receptor.

En los perfiles del poro, se presentan los radios del poro en función de la coordenada Z, permitiendo comparar la expansión del canal en las diferentes estructuras analizadas. En la figura 6, se muestran variaciones en el diámetro del poro a lo largo del eje central del canal, lo que influye directamente en la conducción iónica, donde radios menores a 5 Å podrían representar una restricción al paso de los iones cloruro solvatados, cuyo diámetro oscila entre 6 y 7 Å<sup>59</sup>. La estructura 7M6N (color rojo) presenta el mayor diámetro en la región superior del poro, alcanzando un valor de 10.2 Å, en comparación con 9.4 Å en 7M6S (verde) y 8.2 Å en 6PM6 (morado). Sin embargo, en la parte inferior del canal, 7M6S muestra una reducción del radio a 3.6 Å, presentando un cierre parcial en esa región a diferencia de 7M6S exhibe una apertura más uniforme, con valores que oscilan entre 6.2 y 9.4 Å, lo que nos demuestra una conformación más estable y una apertura mayor para la conducción de iones.

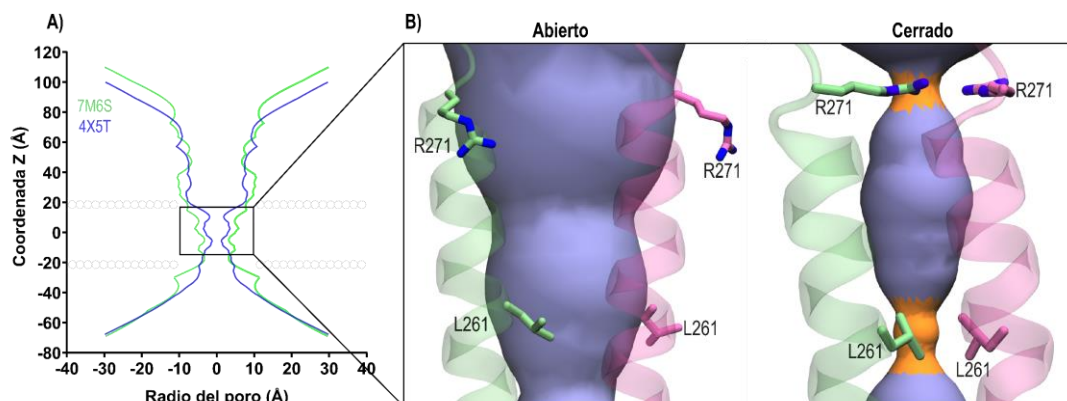


**Figura 6:** Perfiles de expansión del poro en estructuras cristalográficas de conformación abierta. En la mediación del diámetro del poro, se consideraron 3 puntos del dominio transmembranal permitiendo una evaluación más detallada del diámetro en las distintas estructuras cristalográficas.

Además, se identificaron los aminoácidos claves involucrados en el cierre del canal mediante un análisis de poro utilizando la herramienta HOLE. Para ello, se evaluó la estructura quimera del RGl $\alpha$ 1 en su estado conformacional cerrado (PDB ID: 4X5T – Azul) y se comparó con la estructura en estado abierto (PDB ID: 7M6S - Verde). Esta comparación permitió determinar las

regiones estructurales y los residuos específicos que contribuyen al cierre del canal. Con el archivo "hole\_residue\_0.log" generado del análisis fue posible identificar los aminoácidos involucrados en el cierre.

El análisis comparativo del perfil del poro en el RGl $\alpha$ 1 se reveló la participación de los aminoácidos R271 y L261 utilizando la estructura en un estado cerrado (PDB ID: 4X5T). En la figura 7, se aprecia una diferencia en la región central del poro cuando R271 adopta una posición que restringe la apertura reduciendo el radio del poro a 3.8 Å y en el caso de L261, se visualiza una reducción aun mayor de 2.4 Å. Estas reducciones del poro tanto en R271 como L261 desempeñan roles complementarios en la modulación del canal, contribuyendo de manera conjunta el cierre efectivo del RGl $\alpha$ 1.



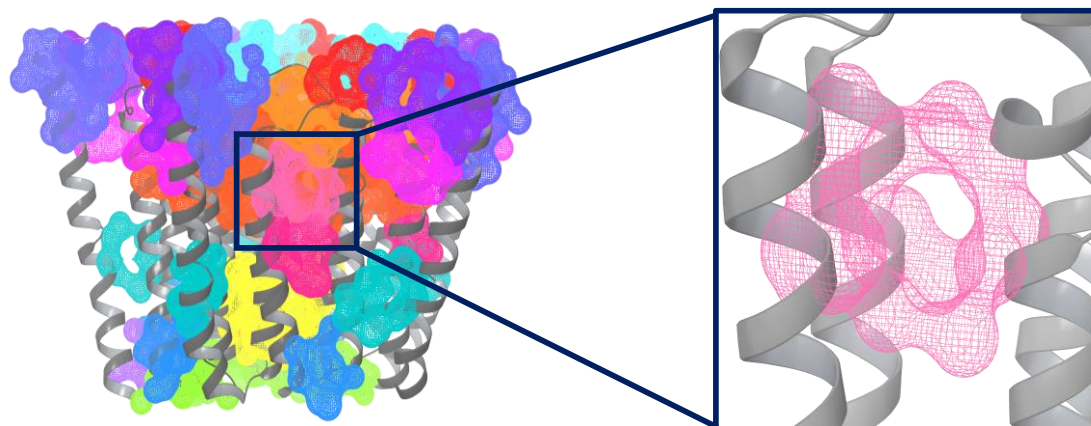
**Figura 7:** Comparación del perfil del poro y aminoácidos involucrados en la apertura y cierre del RGl $\alpha$ 1. A) Comparación del estado conformacional abierto (PDB ID: 7M6S - verde) y cerrado (PDB ID: 4X5T - azul). B)

Aminoácidos involucrados en el cierre del canal. Los residuos R271 y L261 se destacan como determinantes en el cierre del canal, ya que su posición y orientación reducen el diámetro del poro, dificultando el paso de iones cloruro y afectando la funcionalidad del canal.

### **OE1. A2. Identificación del sitio de unión del Propofol**

Posteriormente, se genera la mutación del residuo de arginina en la posición 271 por una glutamina (R271Q) con la estructura del RGl $\alpha$ 1 (PDB ID: 7M6S), utilizando la herramienta *Mutate Residue* de la suite Maestro<sup>43</sup>. Una vez obtenida la estructura mutada, se llevó a cabo un análisis de cavidades con *Fpocket* en la región transmembranal del receptor mutante con el objetivo de identificar posibles sitios de unión para moduladores alostéricos.

La figura 8 muestra la vista general de la región transmembranal (gris) en su conformación pentámera, se obtuvieron un total de 12 cavidades distintas, resaltando con diferentes colores cada una de ellas. La ampliación de la derecha se muestra una cavidad resaltada en color rosa, la cual fue seleccionada para estudios posteriores debido a que esta cavidad se encuentra en una zona entre dos cadenas y está presente la mutación R271Q, junto con los residuos S267 y A288, los cuales han sido identificados mediante estudios de mutagénesis como residuos de interacción clave para el propofol



**Figura 8:** Identificación de cavidades en la región transmembranal del RGl $\alpha$ 1 R271Q.

Luego, se llevó a cabo un análisis de *docking* molecular seguido del cálculo de energía libre de unión (MM-GBSA) en cada una de las cavidades identificadas en el pentámero del RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q) con propofol. Durante el proceso de *docking*, se generaron 10 poses por cavidad, las cuales fueron sometidas a evaluación energética mediante MM-GBSA con el objetivo de estimar la estabilidad y afinidad del propofol en cada sitio de unión. Este análisis permite determinar las interacciones más favorables entre el modular y la cavidad, priorizando aquellas con valores más negativos de  $\Delta G_{\text{bind}}$ , lo que sugiere una mayor estabilidad del complejo proteína-ligando.

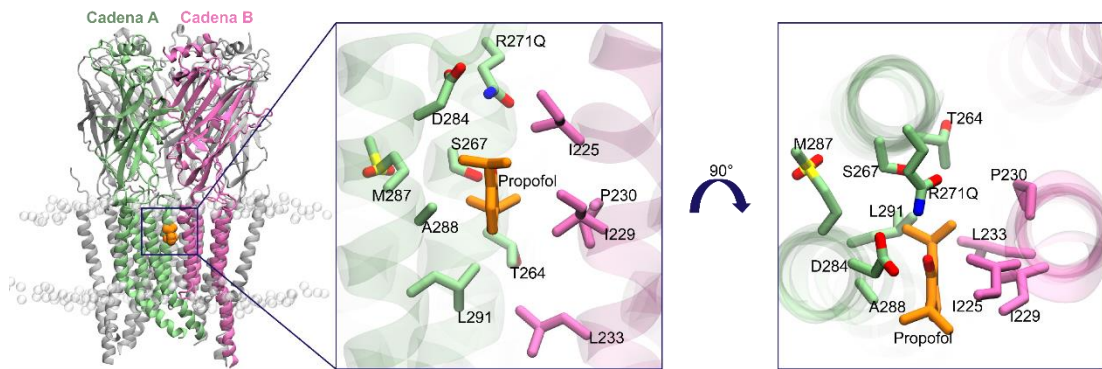
Los valores más negativos de  $\Delta G_{\text{bind}}$  para la cadena AB fue de -33.90 kcal/mol, en BC de -37.42 kcal/mol, en CD de -34.18 kcal/mol, en DE -37.43 kcal/mol y

EA -37.32 kcal/mol (Tabla 3), se utilizaron para realizar las simulaciones de dinámica molecular. Antes de proceder con las simulaciones, se realizó una inspección visual de las poses seleccionadas con el objetivo de verificar que las moléculas de propofol estuvieran correctamente ancladas a las cavidades.

**Tabla 2:** Resultados de *docking* molecular de propofol y cálculo de energía libre de unión en RGl $\alpha$ 1 R271Q.

Poses	Cadena AB		Cadena BC		Cadena CD		Cadena DE		Cadena EA	
	Docking Score (kcal/mol)	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)	Docking Score (kcal/mol)	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)	Docking Score (kcal/mol)	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)	Docking Score (kcal/mol)	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)	Docking Score (kcal/mol)	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)
1	-5.871	-30.39	-5.781	-29.13	-5.989	-34.10	-5.800	-33.59	-5.843	-33.95
2	-5.713	-33.14	-5.750	-34.13	-5.953	-34.18	-5.794	-37.29	-5.787	-29.99
3	-5.613	-31.65	-5.709	-36.95	-5.742	-31.93	-5.709	-32.07	-5.704	-34.02
4	-5.601	-33.90	-5.689	-34.95	-5.684	-31.81	-5.698	-32.17	-5.602	-30.65
5	-5.549	-29.29	-5.678	-31.11	-5.669	-34.09	-5.522	-33.58	-5.569	-31.96
6	-5.503	-29.50	-5.652	-37.42	-5.543	-27.91	-5.470	-25.97	-5.517	-37.15
7	-5.501	-29.59	-5.632	-34.70	-5.435	-26.37	-5.448	-28.07	-5.470	-37.32
8	-5.468	-25.99	-5.561	-31.14	-5.329	-33.81	-5.443	-37.43	-5.438	-34.30
9	-5.453	-33.27	-5.466	-27.62	-5.244	-27.10	-5.410	-25.92	-5.339	-26.98
10	-5.253	-28.89	-5.363	-34.12	-5.219	-27.25	-5.257	-35.48	-5.139	-25.93

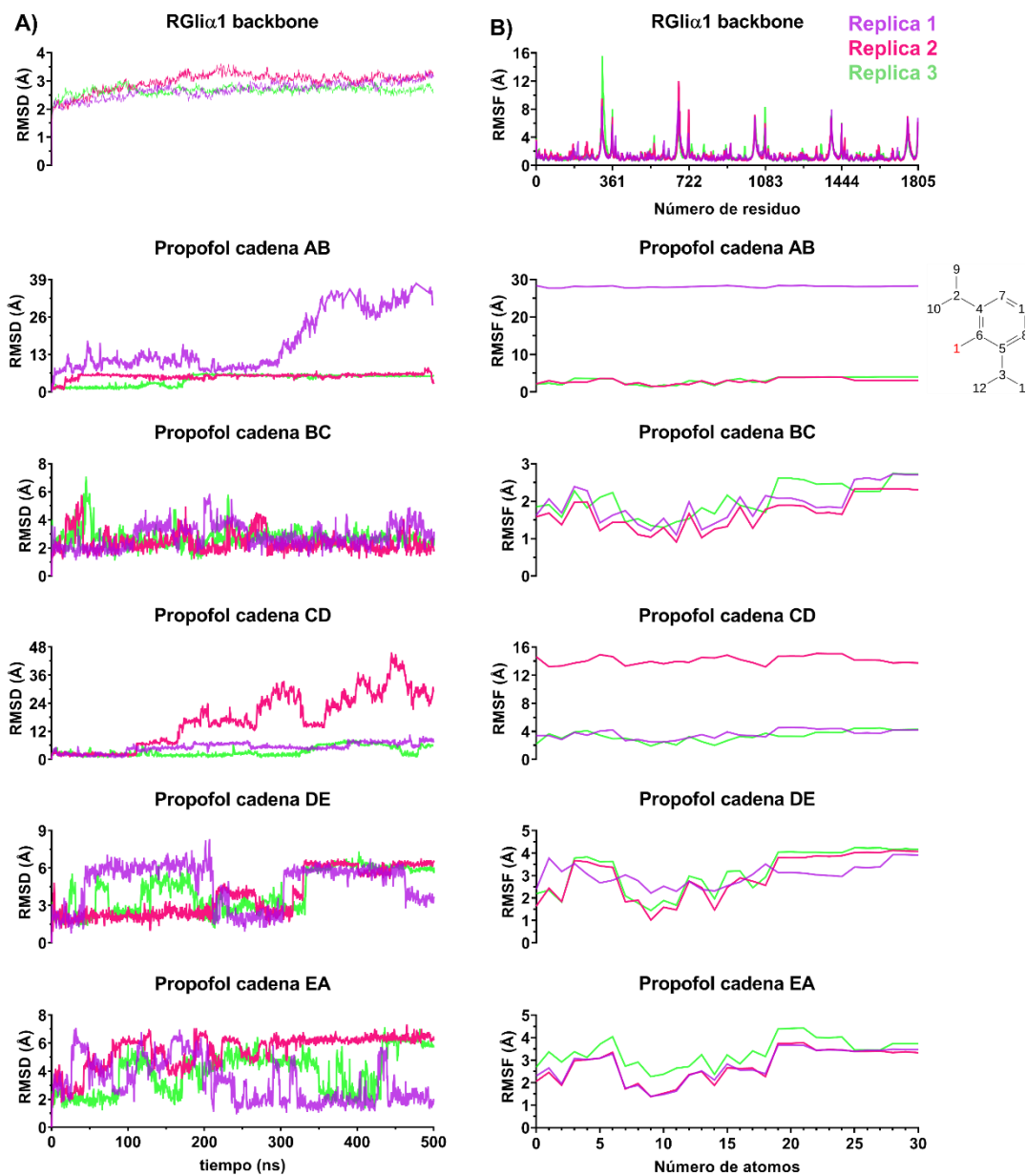
En la figura 9, se representa la estructura del RGl $\alpha$ 1 R271Q, resaltando una de las cavidades seleccionadas localizadas en la interfaz entre las cadenas A y B, mostrando la disposición de los residuos que conforman el sitio de unión, lo que nos proporciona información estructural para la caracterización del entorno de interacción del Propofol y su potencial impacto en la modulación del receptor mutante.



**Figura 9:** Residuos de la cavidad con el propofol en la interfaz entre las cadenas A y B del RGLi $\alpha$ 1 R271Q.

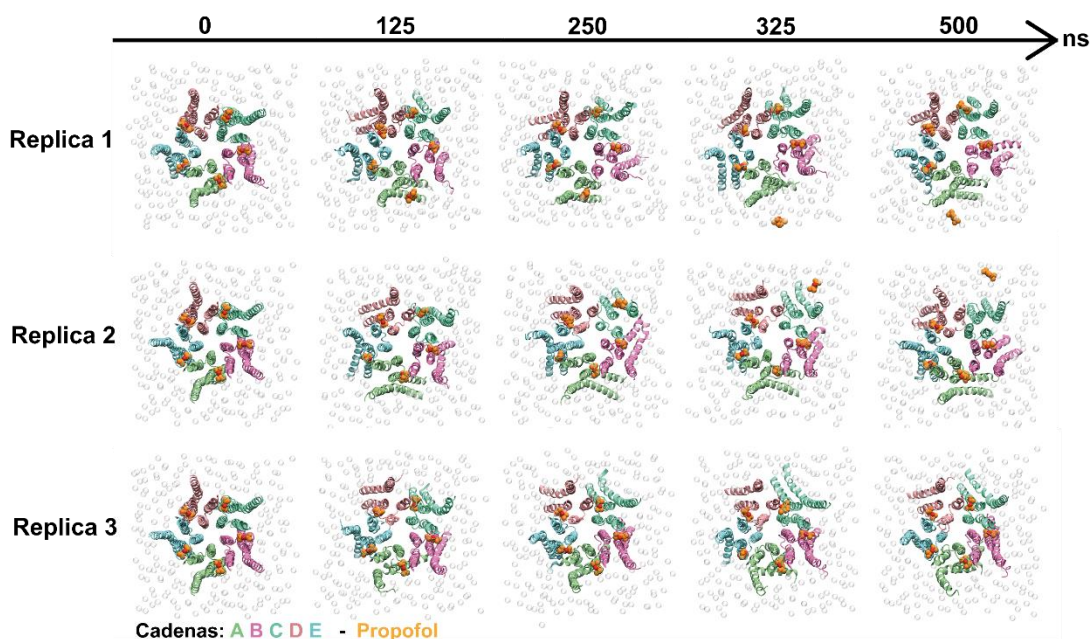
Con las poses seleccionadas se realizó 3 réplicas de DMs de 500 ns para evaluar la estabilidad del complejo RGLi $\alpha$ 1 R271Q - propofol. En la figura 10, se presentan el RMSD y RMSF del *backbone* de RGLi $\alpha$ 1 y del propofol a lo largo de las trayectorias. En el RMSD del *backbone* de la proteína, se observa que el sistema alcanza un estado estable después de los primeros ~100 ns de DMs, lo que mantiene al receptor en su conformación global sin cambios significativos durante toda la trayectoria. En los RMSD del Propofol, se observó que en la réplica 1 en la cavidad AB y en la réplica 2 en la cavidad CD (Figura 10A), el ligando experimentó un incremento significativo en el RMSD, lo que indica que el propofol se desplazó fuera de la cavidad, pero el resto de las DMs mostraron fluctuaciones moderadas dentro de la cavidad sin desplazamientos significativos (Figura 11).

En el RMSF del *backbone* de la proteína, se identificaron fluctuaciones en los extremos y regiones de bucles flexibles, mientras que la estructura central y las hélices transmembranales mostraron menor variabilidad, lo cual nos indica una estabilidad estructural. En el RMSF de los ligandos, se observa que los ligandos donde se permanecieron anclados en la cavidad se mantuvieron en valores bajos, reflejando una interacción estable con los residuos del sitio de unión (Figura 10B). Sin embargo, en los ligandos que se desplazaron se observó pick elevados de RMSF indicándonos que no se generaron las interacciones estables con los residuos de la cavidad (Figura 11).



**Figura 10:** RMSD y RMSF correspondiente al *backbone* del RGlial1 R271Q y de las 5 moléculas de propofol durante las DMs. A) Gráficas de RMSD del *backbone* de la proteína y las moléculas de propofol ancladas en las interfaces de las cadenas AB, BC, CD, DE y EA. B) Las gráficas de RMSF, muestran las fluctuaciones de los residuos del *backbone* de las proteínas y las moléculas

de propofol, permitiendo identificar regiones con mayor flexibilidad o estabilidad estructural.

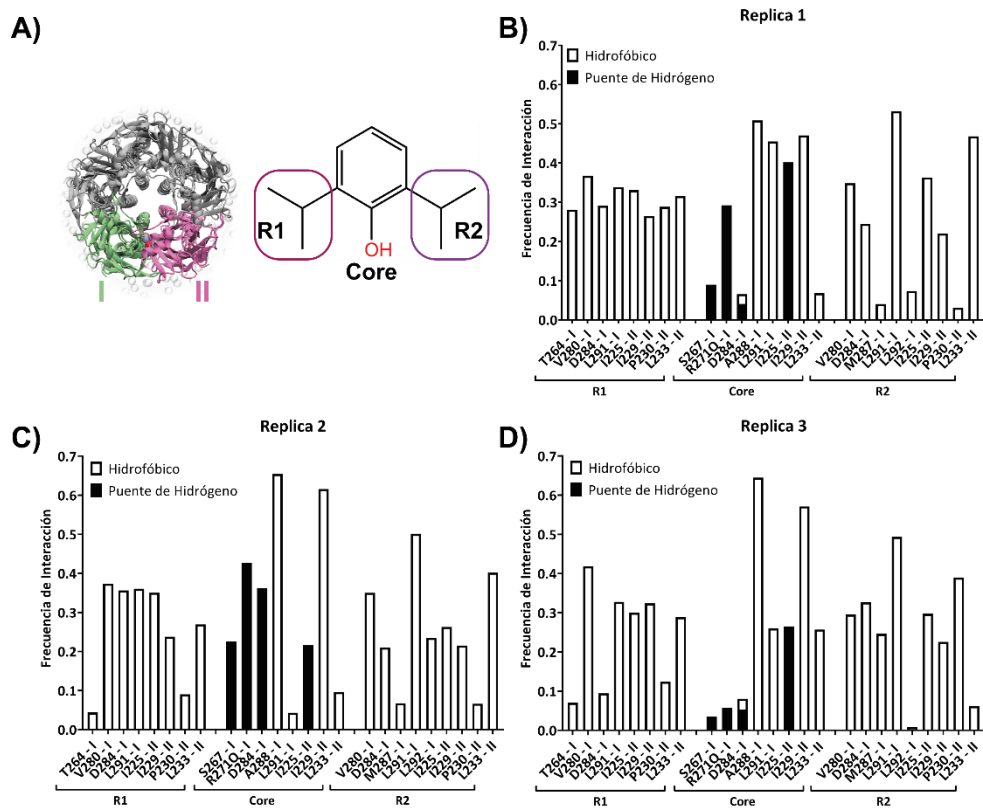


**Figura 11:** Comportamiento del Propofol en el sitio de unión del RGlir1 R271Q durante los 500 ns de DMs. Se presenta la trayectoria desde una vista superior tomada en los 0, 125, 250, 325 y 500 ns, en las que se observa la posición del propofol (naranja) respecto a las subunidades del RGlir1 mutante. Las esferas grises corresponden a la membrana.

Como parte del análisis de las DMs, se evaluó la frecuencia de interacción del Propofol con los residuos presentes en la cavidad de unión. En las gráficas (figura 12) se muestra el promedio de las interacciones de las 5 moléculas de propofol por replica, nos permite identificar los residuos con mayor estabilidad

en la interacción con el ligando a lo largo de la trayectoria. Para la realización de un análisis detallado, el propofol se fragmentó en 3 partes con el propósito de seleccionar el fragmento más estable como semilla para el diseño *de novo* de moduladores (Figura 12A): R1 y R1 (grupos isopropilo), *core* (fenol). Dado que las 5 cavidades seleccionadas se encuentran en la interfaz de dos cadenas, se denominaron las regiones como I y II en función del movimiento de la proteína de las 5 cavidades analizadas.

Los resultados obtenidos mostraron que en el fragmento R1, los residuos con mayor frecuencia de interacción que se mantuvieron en las 3 réplicas fueron I225, L233, L291 y V280. En el *core* del propofol, se identificaron frecuencias de interacción con I225, I229 y A288. Para el R2 fueron los residuos I225 y L291 (Figura 12B, C y D). A partir del análisis de interacciones, se seleccionó el *core* como fragmento semilla para el diseño *de novo*, dado que presenta interacciones como puentes de hidrógenos que son interacciones más fuertes que las interacciones hidrofóbicas y los residuos A288 y I229 tienen valores de frecuencia de interacción mayor a 0.5.



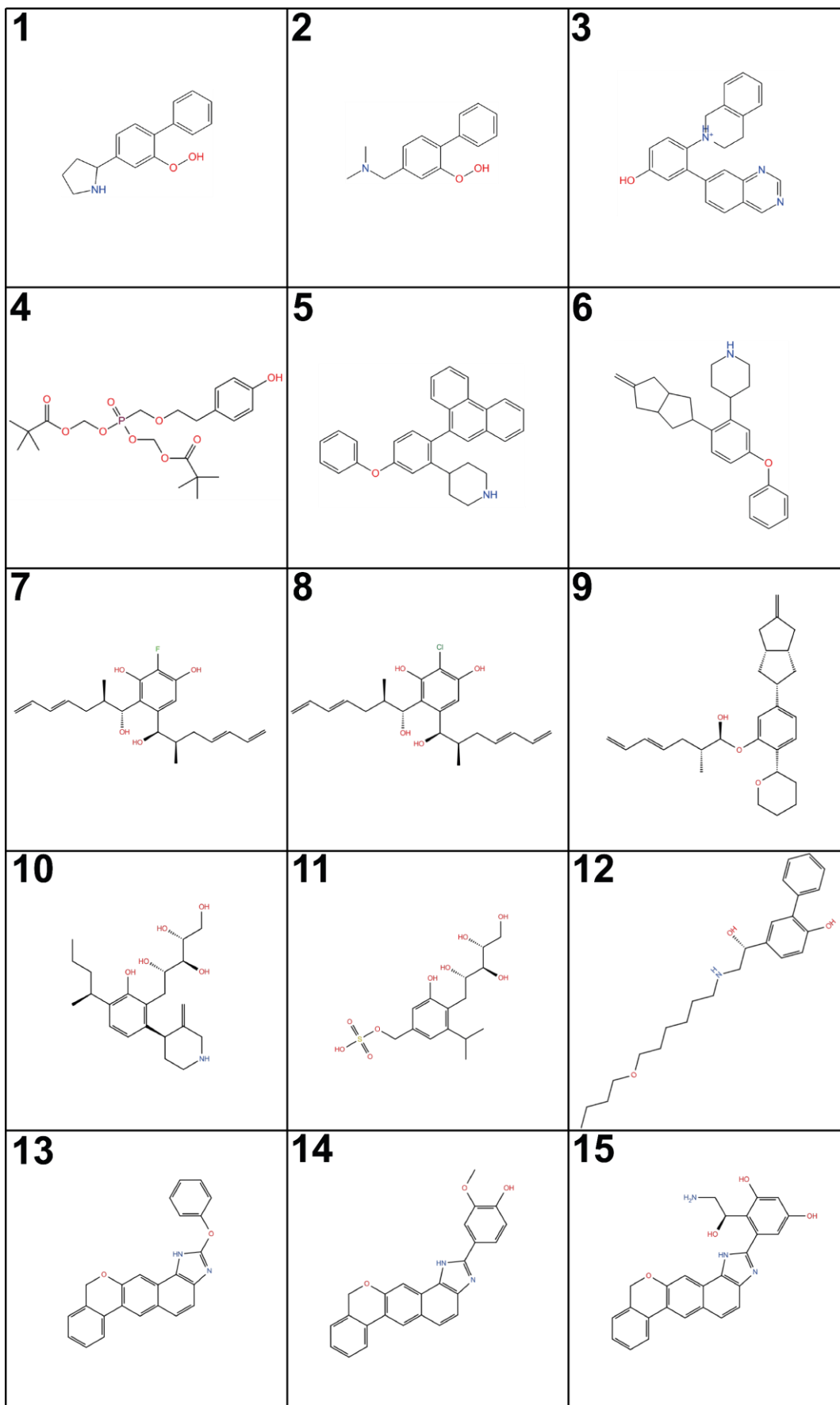
**Figura 12:** Frecuencia de interacción del propofol con los residuos de la cavidad del RGLi1 R271Q durante las DMs. A) Representación superior de la cavidad diferenciando las cadenas I y II, donde se localizan los residuos que interactúan con el propofol. Además, se muestra la fragmentación del propofol en 3 partes: R1 (isopropilo), core (fenol) y R2 (isopropilo). B, C y D) Distribución de la frecuencia de interacción de los residuos con cada fragmento del propofol en las réplicas 1, 2 y 3, respectivamente. El análisis se realizó con el promedio de las 5 moléculas de propofol que presenta el complejo.

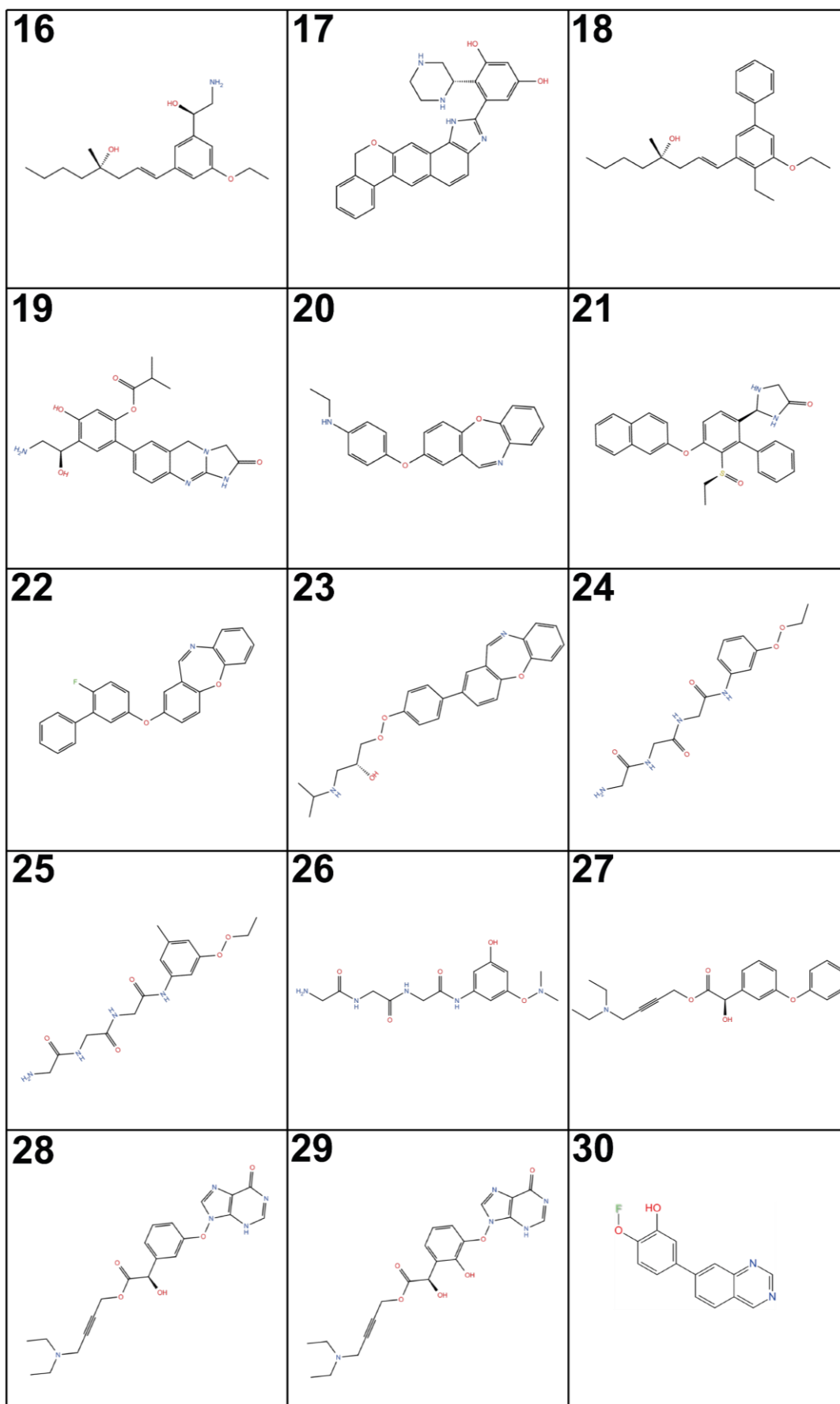
**OE2. Diseño de moléculas asistido por computador que se unan al potencial sitio de unión de RGl $\alpha$ 1 mutante (R271Q).**

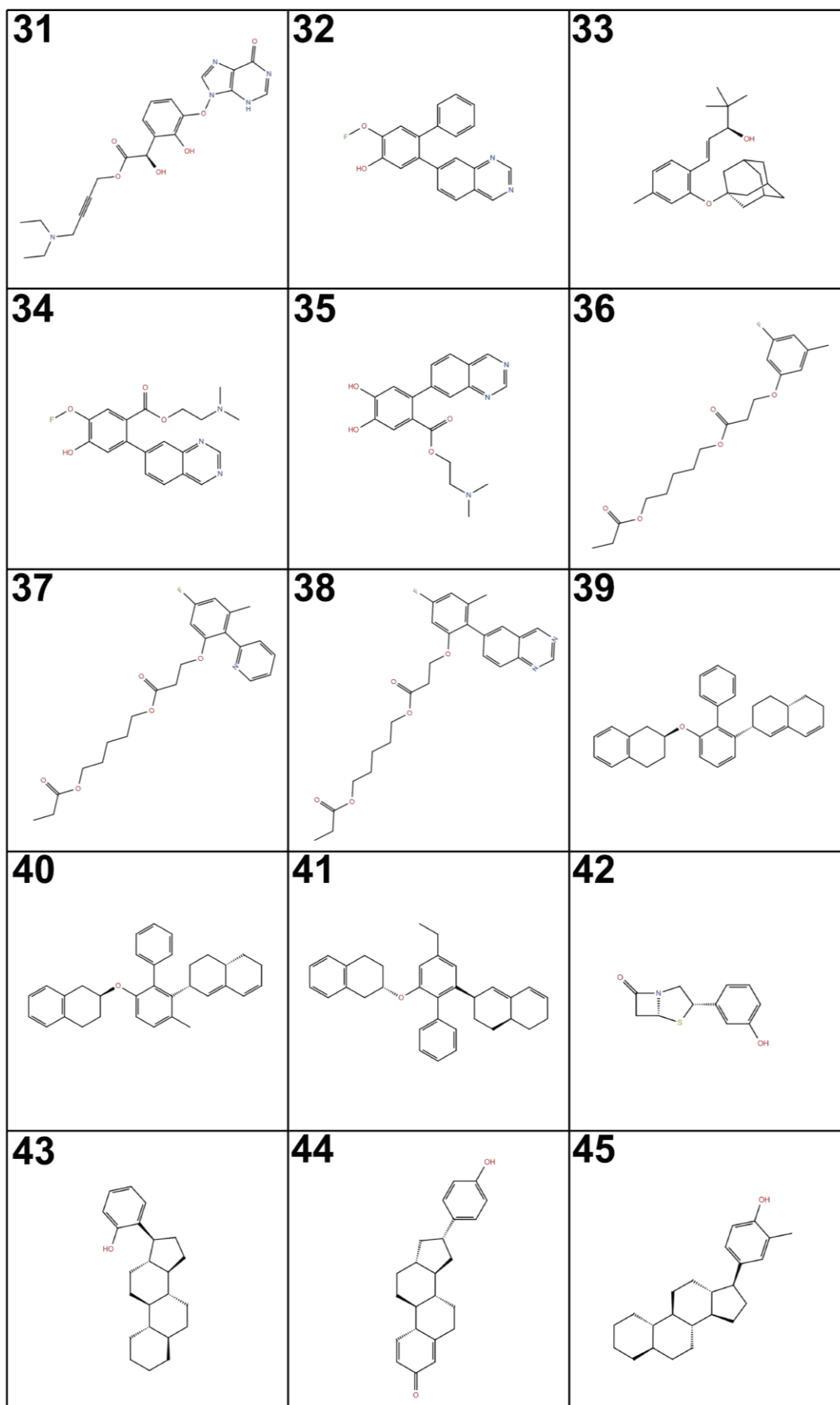
**OE2.A1. Diseño *de novo* de moléculas moduladoras**

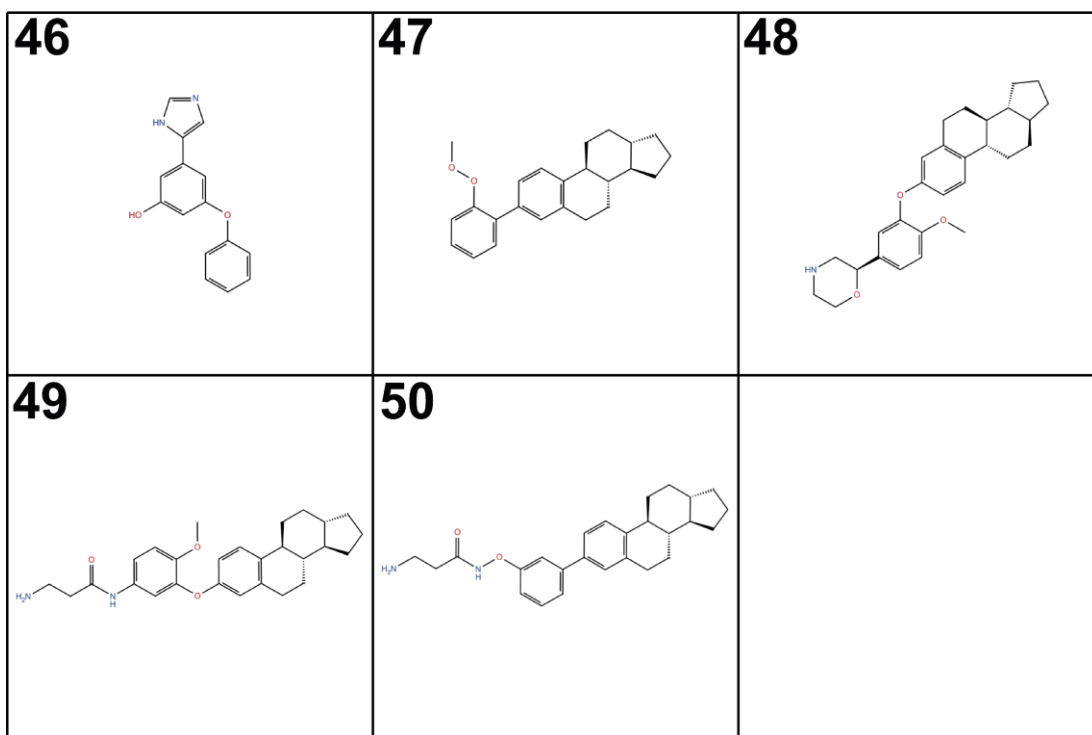
El diseño *de novo* de los compuestos se llevó a cabo con la utilización del servidor web *E-LEA3D*, donde se generaron 50 moléculas derivadas del fenol como fragmento semilla (Figura 13). Posteriormente, estas moléculas fueron sometidas a un análisis de agrupamiento mediante la herramienta *Clustering Base don Volume Overlap* de la suite *Maestro*, con el fin de identificar patrones estructurales comunes, lo que nos permitió identificar el número óptimo de clústeres a través de 3 gráficos para una correcta agrupación de los 50 compuestos. El Dendrograma (Figura 14A) nos muestra la relación de similitud entre las moléculas en función del solapamiento volumétrico. En la determinación del número óptimo de clústeres se empleó el parámetro Penalización de Kelley, utilizado para determinar el número óptimo de clústeres mediante el análisis de la distribución y compactación de las agrupaciones moleculares<sup>61</sup>, la cual presenta un mínimo local en 5 clústeres indicándonos un equilibrio entre la diversidad estructural y la estabilidad del agrupamiento (Figura 14B) y para la validación de *Kelley Penalty* se analizó la gráfica de Distancia de Similitud.

La gráfica de Distancia de Similitud representa la proximidad entre clústeres durante el proceso de agrupación jerárquica, permitiendo observar cómo se incrementa la distancia entre grupos a medida que se van unificando<sup>62</sup>, en la cual nos da una inflexión en los 5 clústeres (Figura 14C). En base a estos resultados, las moléculas se agruparon en 5 clústeres y se seleccionó una molécula representativa por cada clúster, la cual se tomó como criterio el centroide de cada clúster (Tabla 4).

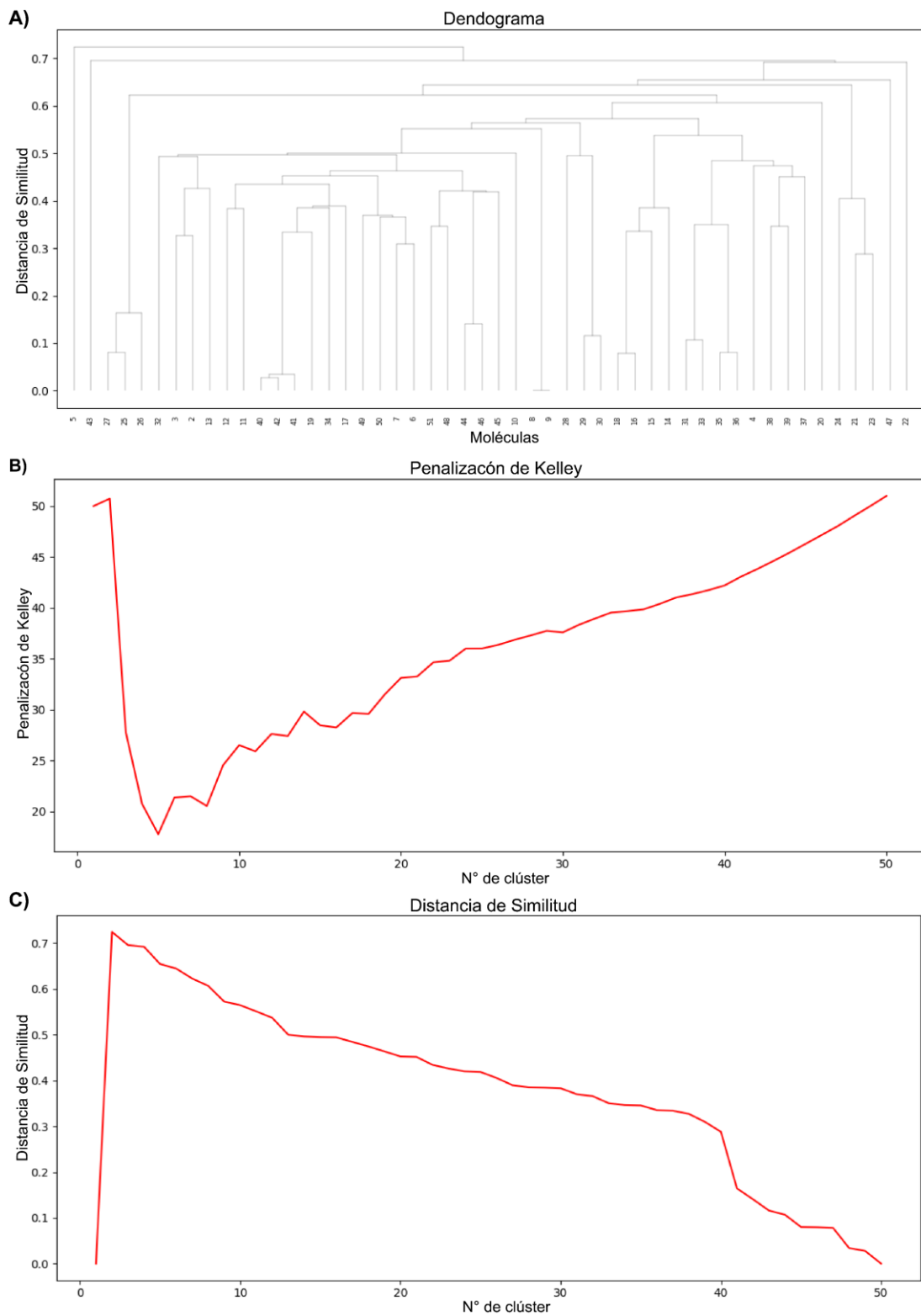








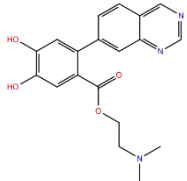
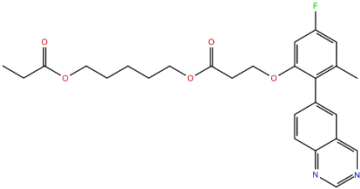
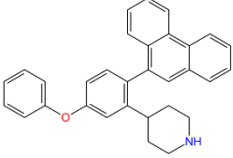
**Figura 13:** Moléculas diseñadas *de novo* con fragmento de partida el fenol. Se diseñaron 50 moléculas con el servidor web E-LEA3D.

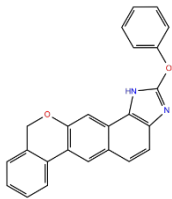
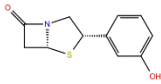


**Figura 14:** Análisis de Clústeres: Dendrograma, Penalización de Kelley y Distancia de Similitud. A) Gráfico de Dendrograma que representa la

agrupación jerárquica de las moléculas según su similitud estructural. B) Gráfico de Penalización de Kelley indica que el número óptimo de clústeres es cinco, ya que se observa un punto de inflexión claro en ese valor. C) Gráfico de Distancia de Similitud muestra un aumento pronunciado a partir del quinto clúster, lo que sugiere que cinco es el número óptimo de agrupaciones, ya que a partir de ese punto se perdería cohesión entre los elementos agrupados.

**Tabla 3:** Agrupamiento de las moléculas generadas mediante diseño *de novo* en 5 clúster.

N° de clúster	Cantidad de moléculas	Molécula representativa
1	33	
2	13	
3	2	

4	1	
5	1	

### OE3. Cribado virtual de moléculas disponibles en bases de datos

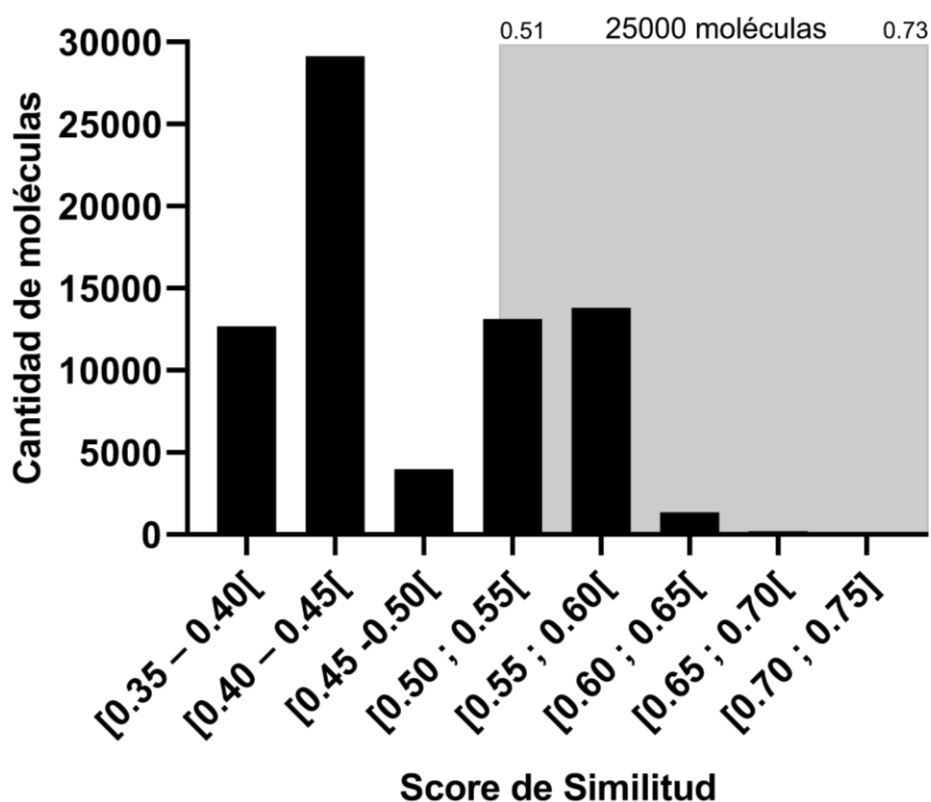
#### comerciales

#### OE3.A1. Detección virtual basada en la forma de las moléculas

#### diseñadas *de novo*

Las moléculas representativas de cada clúster fueron utilizadas en el cribado basado en forma mediante la herramienta *GPU Shape Screening* de la suite Maestro, el cual nos permite identificar moléculas con alta similitud estructural, las que se compararon con una base de datos de ~ 14 millones de moléculas disponibles comercialmente. La base de datos utilizada fue diseñada por integrantes del laboratorio del Dr. David Ramírez. El cribado virtual mediante *Shape Screening* permitió la identificación de 74320 moléculas con alta similitud respecto a las 5 moléculas representativas seleccionadas en el análisis de clústeres (Figura 15). Sin embargo, debido al elevado número de compuestos obtenidos, se implementó un filtro adicional basado en el *Score*

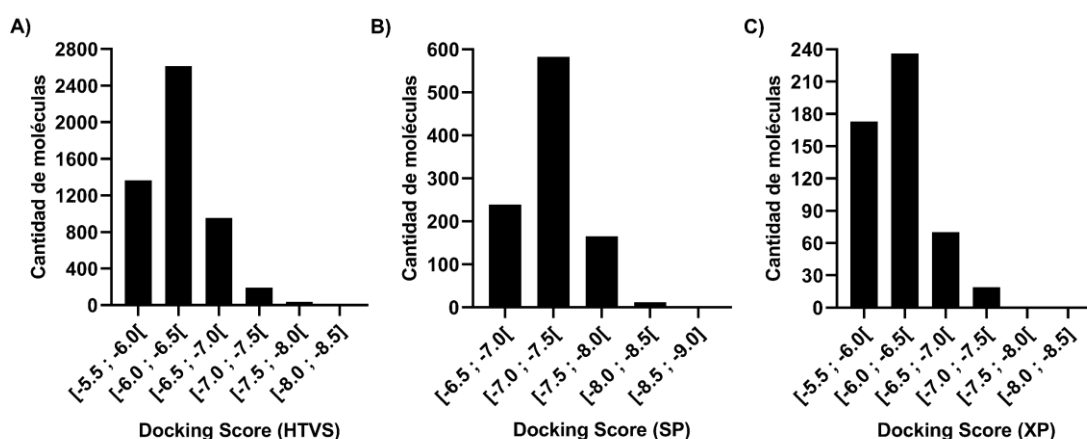
de Similitud. De esta forma se seleccionó un subconjunto de 25000 moléculas (sombreado con gris) de mejor score para la optimizar la eficiencia del cribado molecular (Figura 15).



**Figura 15:** Distribución de las moléculas según el score de similitud en el cribado virtual. La figura muestra un histograma que representa la frecuencia de moléculas en función de su score de similitud estructural obtenido durante el cribado virtual. Lo sombreado en gris son las 25000 moléculas mejor posicionadas, cuya similitud con la molécula de referencia se encuentra en el rango de 0.51 a 0.73.

### OE3.A2. Docking molecular

A partir de las 25000 moléculas obtenidas del *Shape Screening*, se llevó a cabo un proceso de cribado virtual secuencial mediante *docking* molecular utilizando 3 tipos de precisión: HTVS, SP y XP. Inicialmente, se realizó un *docking* molecular HTVS seleccionando el 20% de los compuestos con mejor *docking score*, reduciendo el número de moléculas a 5000 (Figura 16A). Posteriormente, las moléculas obtenidas del *docking* HTVS fueron sometidas a un *docking* molecular SP aplicando el mismo criterio de selección y obteniendo 1000 moléculas con los mejores valores de *docking score* (Figura 16B). Luego, estas 1000 moléculas fueron cribadas usando *docking* XP y se seleccionó el 50% de los compuestos con mejor *docking score*, obteniendo finalmente 500 moléculas (Figura 16C).

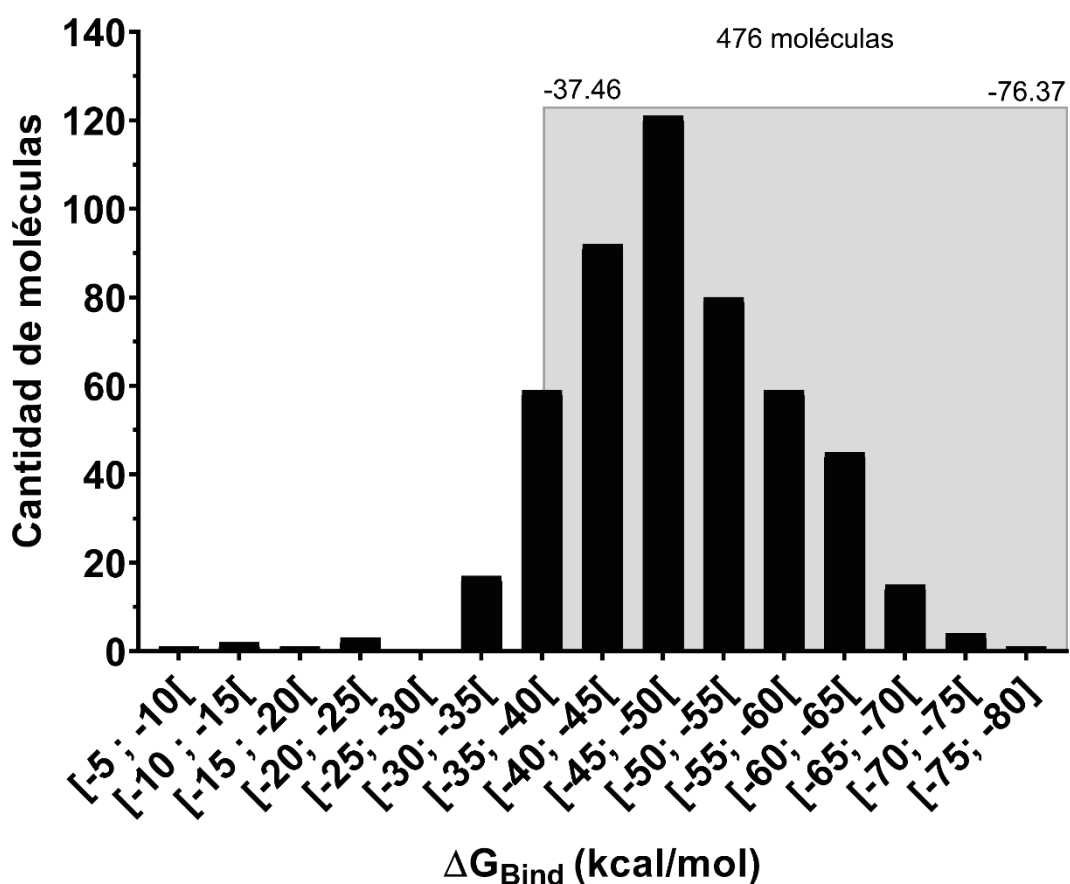


**Figura 16:** Distribución de moléculas seleccionadas en cada etapa del *docking* molecular HTVS, SP y XP en función de su *docking score*. A) El

histograma ilustra la distribución de las 5000 moléculas seleccionadas tras la aplicación del *docking* molecular de tipo HTVS, representando el segundo filtrado del cribado virtual. B) Se presenta la distribución de las 1000 moléculas resultantes del tercer filtrado, correspondiente al *docking* molecular con SP. C) El último histograma muestra la distribución de las 500 moléculas finales obtenidas mediante *docking* molecular de precisión extra (XP), reflejando la selección más estricta en función del *docking score*.

### **OE3.A3. Post-procesamiento de resultados de *docking* mediante predicción de energía libre de unión**

Con las 500 moléculas seleccionadas del *docking* molecular XP, se le realizó un post-procesamiento de los resultados mediante predicción de energía libre de unión (MM-GBSA). Se realizó un filtrado llevando el criterio de que todas las moléculas que presenten un  $\Delta G_{\text{Bind}}$  menor al del propofol (-37.43 kcal/mol) quedándonos con 476 moléculas (Figura 17).



**Figura 17:** Distribución de la energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{Bind}}$ ) de las moléculas obtenida del *docking* molecular XP y selección de aquellas con un  $\Delta G_{\text{Bind}}$  menor al del propofol. La figura muestra un histograma que representa la cantidad de moléculas según su energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{Bind}}$ ), calculada mediante MM-GBSA. La región sombreada en gris indica aquellas moléculas cuyo  $\Delta G_{\text{Bind}}$  es menor al del ligando de referencia (propofol). Un total de 476 moléculas cumplen con este criterio y fueron seleccionadas como potenciales candidatas por presentar una mayor afinidad de unión.

### **OE3.A4. Predicción de las propiedades ADMET**

A las 476 moléculas con valores de  $\Delta G_{\text{Bind}}$  más favorables, se le aplicó un nuevo criterio de filtrado basado en las propiedades farmacocinéticas enfocándonos principalmente en la permeabilidad a la barrera hematoencefálica (BHE) y la solubilidad en medios acuosos. Para este análisis, se empleó el servidor web *SwissADME* que nos permite predecir el comportamiento farmacocinético de las moléculas. Del total de 476 moléculas evaluadas, se seleccionaron 11 compuestos que cumplían con los criterios de permeabilidad a la BHE y solubilidad adecuada, el cual se establece un conjunto optimizado de candidatos con propiedades favorables para su evaluación experimental.

Posteriormente, a las 11 moléculas seleccionadas se le realizó un análisis del valor de QED que permite estimar de manera cuantitativa qué tan compatibles son los compuestos con las características comúnmente observadas en fármacos aprobados, considerando propiedades clave como el peso molecular, lipofilia (LogP), polaridad, número de enlaces rotables, capacidad de formar enlaces de hidrógeno, entre otros<sup>58</sup>. La aplicación del QED fue relevante para asegurar que las moléculas con buena afinidad teórica también tuvieran perfiles fisicoquímicos aceptables<sup>58</sup>. Las 11 moléculas seleccionadas presentaron valores de QED dentro del rango aceptable ( $\text{QED} \geq 0.6$ , valores cercanos a 1), lo que indica que poseen propiedades compatibles con los estándares de “*drug-likeness*”. Por lo tanto, no fue necesario descartar ningún

compuesto en esta etapa, lo que refuerza la solidez del protocolo de cribado aplicado y respalda el potencial de estas moléculas como moduladores del RGl $\alpha$ 1 mutado.

**Tabla 4:** Moléculas seleccionadas tras filtrado de permeabilidad de la BHE y solubilidad.

Base de dato	Nombre comercial	Peso molecular (g/mol)	$\Delta G_{\text{Bind}}$ (kcal/mol)	QED	Permeabilidad de la BHE	Solubilidad
Molport	MolPort-003-032-682	325.40	-71.27	0.92	Si	Soluble
Molport	MolPort-003-844-864	256.30	-64.16	0.84	Si	Soluble
Molport	MolPort-039-070-985	281.35	-63.55	0.94	Si	Soluble
Enamine	Z1545990911	339.36	-62.21	0.77	Si	Soluble
Molport	MolPort-039-035-828	249.31	-60.50	0.86	Si	Soluble
Molport	MolPort-044-701-689	259.34	-49.88	0.89	Si	Soluble

Enamine	Z366057622	318.27	-49.27	0.78	Si	Soluble
Enamine	Z237705572	251.40	-48.20	0.78	Si	Soluble
Enamine	Z319331018	318.33	-46.21	0.61	Si	Soluble
Enamine	Z26395601	304.35	-46.00	0.91	Si	Soluble
Enamine	Z1544898481	341.34	-44.38	0.77	Si	Soluble
---	Propofol	178.27	-37.43	0.73	Si	Soluble

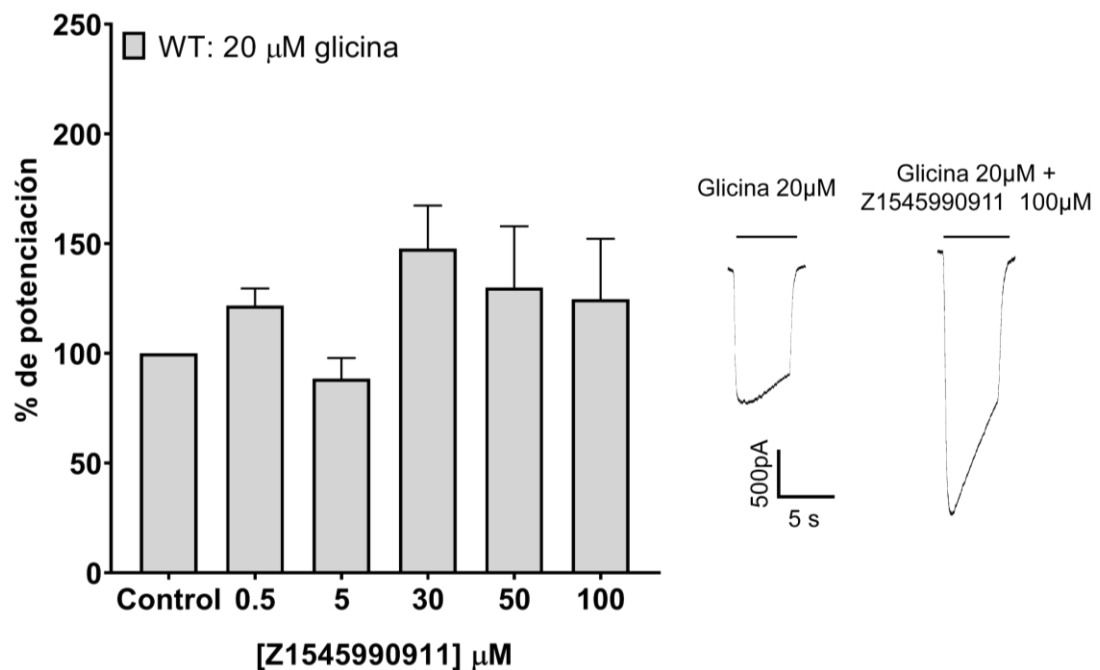
#### **OE4. Caracterización farmacológica de las moléculas con resultados**

**más promisorios, mediante electrofisiología.**

##### **OE4.A4. Registros Electrofisiológico.**

Los registros electrofisiológicos para la evaluación farmacológica de los compuestos seleccionados se llevaron a cabo en células HEK293 transfectadas con RGl $\alpha$ 1 y RGl $\alpha$ 1 R271Q. Debido a limitaciones de tiempo y costos, solo se pusieron a prueba los seis compuestos provenientes de la base de datos Enamine. Para el RGl $\alpha$ 1 WT se realizaron curvas de potenciación utilizando una concentración fija de glicina a 20  $\mu$ M, mientras que las moléculas seleccionadas se evaluaron en concentraciones de 0.5, 5, 30, 50 y 100  $\mu$ M con el objetivo de caracterizar su efecto modulador sobre la actividad del receptor.

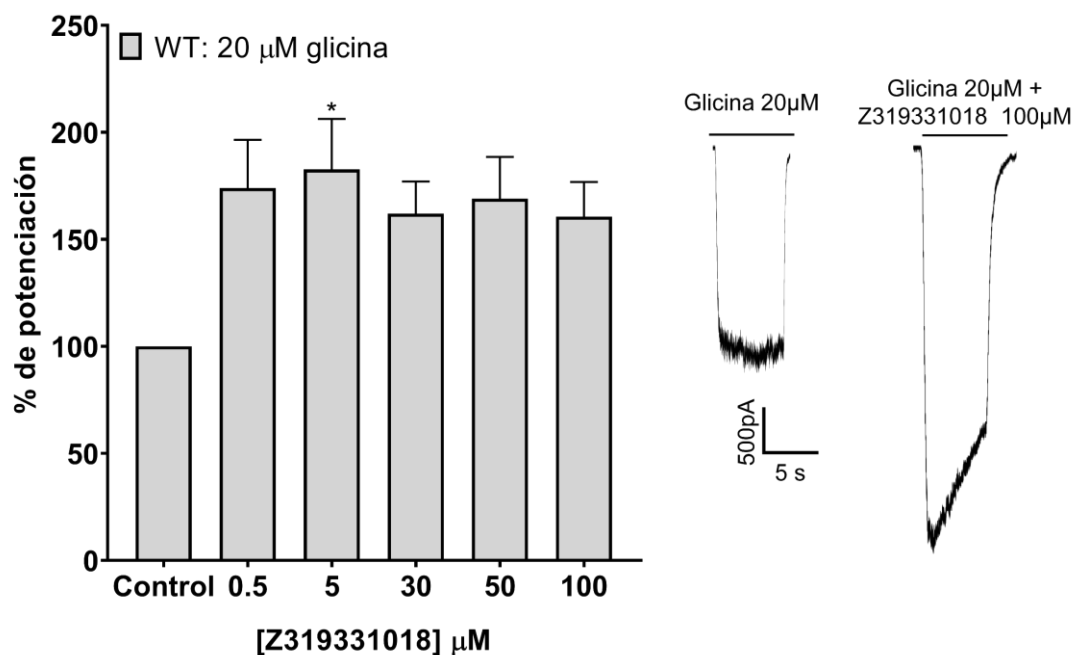
La molécula Z1545990911 mostró un incremento de aproximadamente un 150% en la potenciación del RGl $\alpha$ 1 WT, lo cual representa una mejora funcional moderada (Figura 18). El efecto máximo se observó a una concentración de 30  $\mu$ M, mientras que a concentraciones superiores (50 y 100  $\mu$ M) se evidenció una disminución en la respuesta, lo que sugiere una posible pérdida de eficacia a concentraciones más altas.



**Figura 18:** Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por Z1545990911 en RGl $\alpha$ 1 WT. Potenciación del RGl $\alpha$ 1 WT en presencia de Z1545990911 a concentraciones crecientes (0.5, 5, 30, 50 y 100  $\mu$ M) con glicina a 20  $\mu$ M. Cada punto de datos es la media  $\pm$  SEM de 4 células y se

analizó con ANOVA de una vía. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P 0.002$  y \*  $P 0.033$  frente al control.

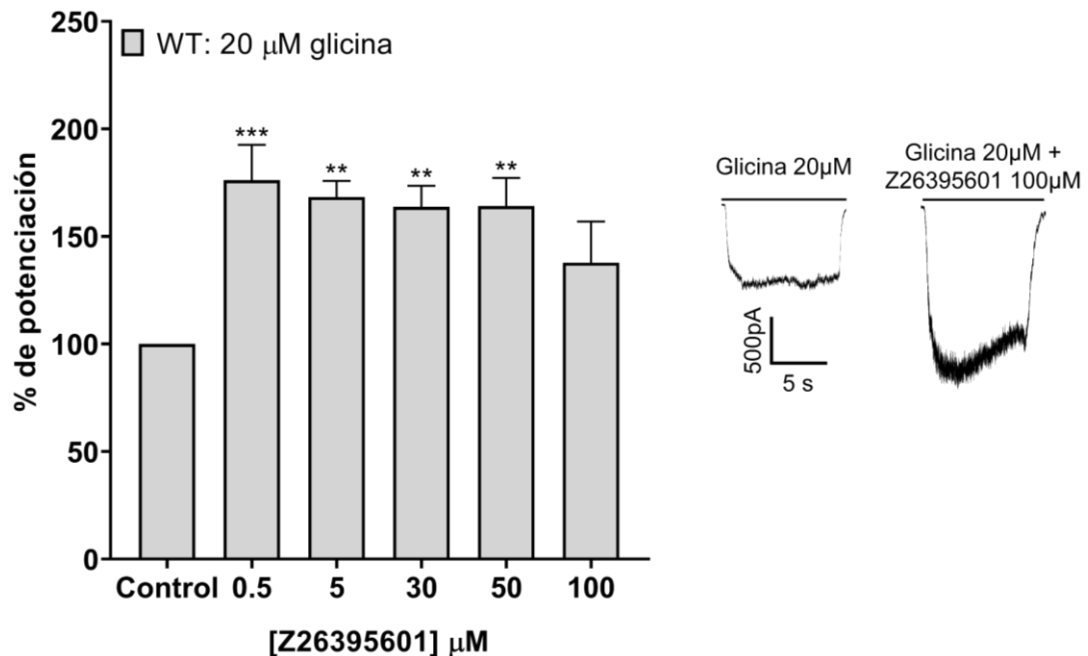
En la segunda molécula Z319331018, perteneciente a la base de datos Enamine, alcanzó un aumento de potenciación del RGl $\alpha$ 1 WT de aproximadamente un 180%, con un efecto máximo observado a una concentración de 5  $\mu$ M. Sin embargo, a concentraciones superiores, se evidenció una disminución progresiva en la respuesta.



**Figura 19:** Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por Z319331018 en RGl $\alpha$ 1 WT. Potenciación del RGl $\alpha$ 1 WT en presencia de Z319331018 a concentraciones crecientes (0.5, 5, 30, 50 y 100  $\mu$ M) con glicina

a 20  $\mu\text{M}$ . Cada punto de datos es la media  $\pm$  SEM de 3 células y se analizó con ANOVA de una vía. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P 0.002$  y \*  $P 0.033$  frente al control.

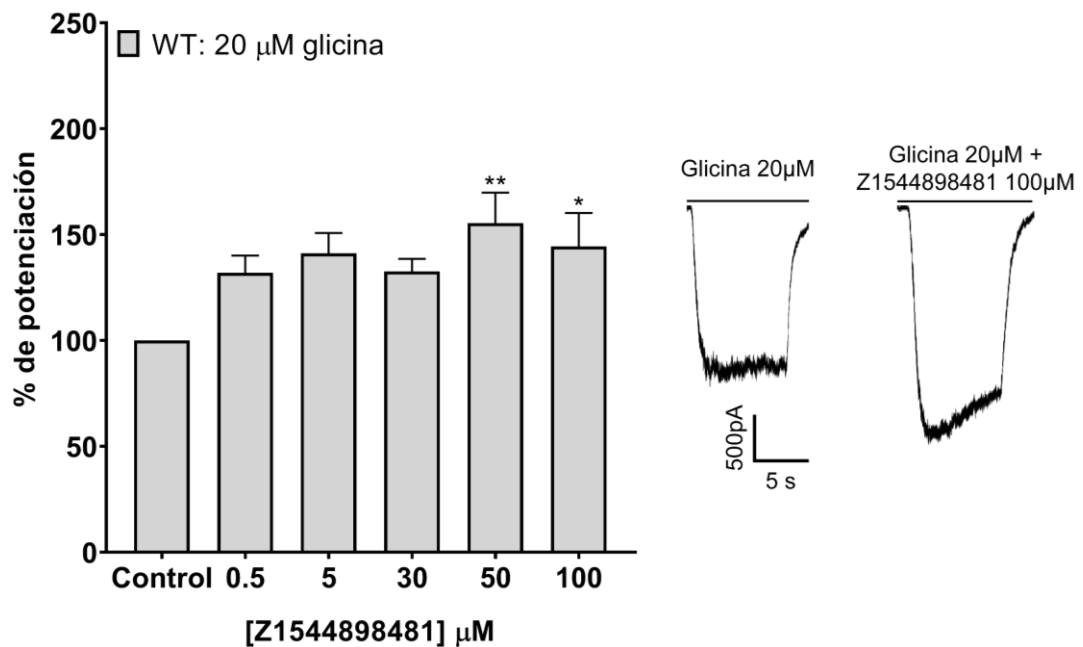
La tercera molécula Z26395601, mostró un aumento de potenciación cercano al 175% a una concentración de 0.5  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, al incrementar la concentración se observó una ligera disminución en la respuesta. En las concentraciones de 5, 30 y 50  $\mu\text{M}$ , la potenciación se mantuvo relativamente constante. No obstante, a 100  $\mu\text{M}$  se registró una caída de aproximadamente un 30% en la respuesta en comparación con las concentraciones intermedias.



**Figura 20:** Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por Z26395601 en RGLi $\alpha$ 1 WT. Potenciación del RGLi $\alpha$ 1 WT en presencia de

Z26395601 a concentraciones crecientes (0.5, 5, 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) con glicina a 20  $\mu\text{M}$ . Cada punto de datos es la media  $\pm$  SEM de 6 células y se analizó con ANOVA de una vía. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P 0.002$  y \*  $P 0.033$  frente al control.

La cuarta molécula analizada fue Z1544898481, que alcanzó una potenciación del RGl $\alpha$ 1 WT de aproximadamente un 155% a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , representando su efecto máximo. Sin embargo, al incrementar la concentración a 100  $\mu\text{M}$ , se observó una disminución en la respuesta.

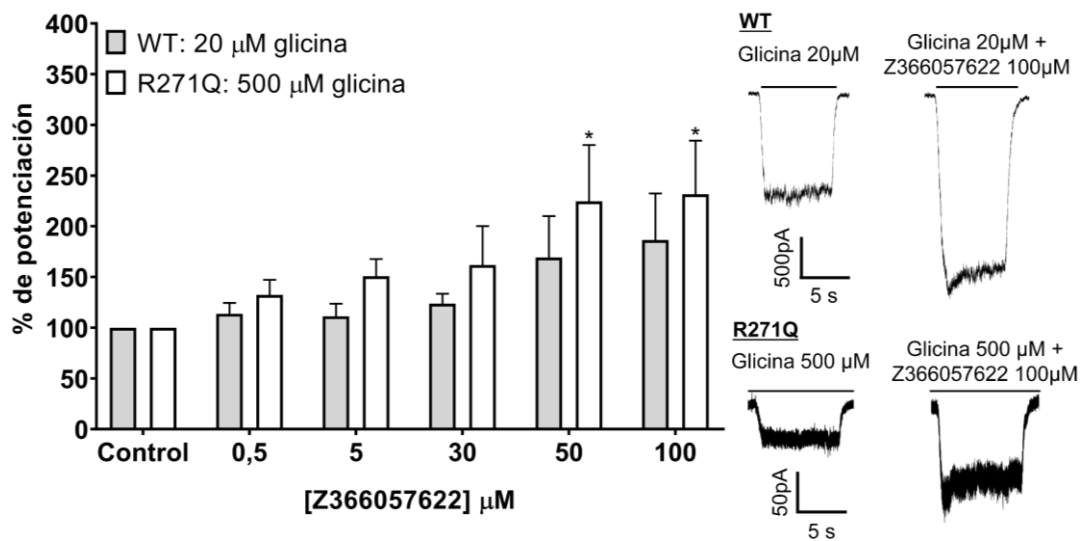


**Figura 21:** Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por Z1544898481 en RGl $\alpha$ 1 WT. Potenciación del RGl $\alpha$ 1 WT en presencia de Z1544898481 a concentraciones crecientes (0.5, 5, 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) con

glicina a 20  $\mu$ M. Cada punto de datos es la media  $\pm$  SEM de 5 células y se analizó con ANOVA de una vía. \*\*\* P < 0.001, \*\* P 0.002 y \* P 0.033 frente al control.

En el caso del RGl $\alpha$ 1 R271Q se emplearon las mismas concentraciones de los compuestos, pero con una concentración de glicina ajustada a 500  $\mu$ M, debido a que se genera una disminución en la sensibilidad del receptor mutante. Sin embargo, por razones de tiempo solo se evaluaron dos de las seis moléculas seleccionadas con mayor porcentaje de potenciación.

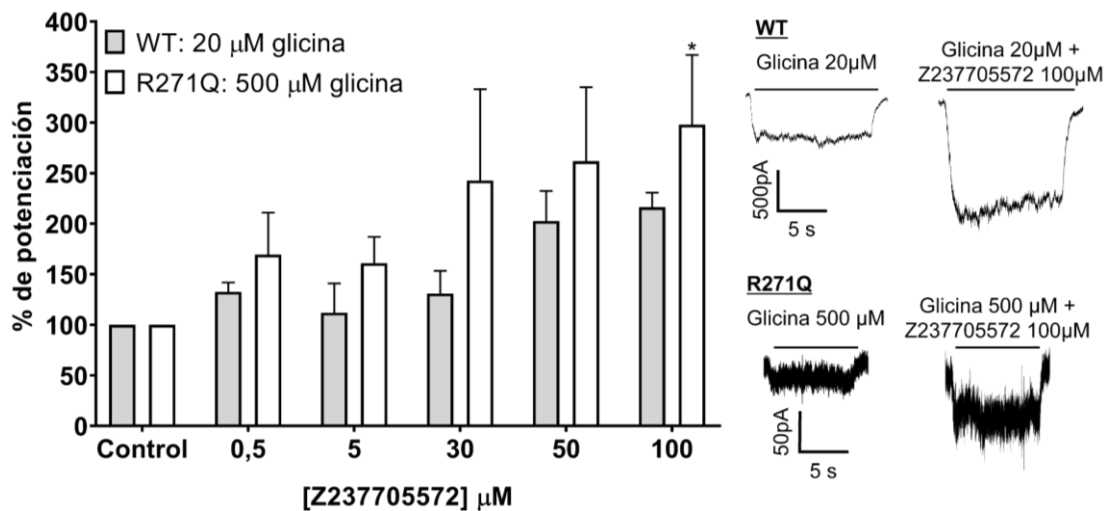
La molécula Z366057622 mostró un efecto modulador positivo sobre el RGl $\alpha$ 1 WT, alcanzando un porcentaje de potenciación de aproximadamente 190% a una concentración de 100  $\mu$ M (Figura 22). En el receptor mutante RGl $\alpha$ 1 R271Q, la misma molécula evidenció una potenciación cercana al 230%, lo que representa un incremento superior al doble en comparación con el control sin compuesto (Figura 22). Estos resultados sugieren que Z366057622 posee una mayor eficacia sobre la variante mutante del receptor, posicionándola como una candidata prometedora para futuras evaluaciones funcionales.



**Figura 22:** Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por la molécula Z366057622 en RGLiα1 WT y RGLiα1 R271Q. Potenciación del RGLiα1 WT y R271Q en presencia de Z366057622 a concentraciones crecientes (0.5, 5, 30, 50 y 100 μM) con glicina a 20 μM y 500 μM, respectivamente. Los datos se expresaron como media ± SEM de 5 a 6 células y se realizó un análisis de ANOVA de dos vías \*\*\* P < 0.001, \*\* P 0.002 y \* P 0.033 frente al control.

La molécula Z237705572 mostró un efecto modulador significativo sobre el RGLiα1. En la condición WT, se observó una potenciación de aproximadamente 215% a una concentración de 100 μM (Figura 23). En contraste, en el receptor mutante RGLiα1 R271Q, la misma concentración produjo un aumento cercano al 300%, lo que representa un incremento 3 veces en comparación con el control sin compuesto (Figura 23). Este resultado indica una mayor eficacia del compuestos en la variante mutante, lo

que refuerza su potencial como modulador alosterico positivo con relevancia terapeutica en el contexto de la enfermedad de hiperekplexia.



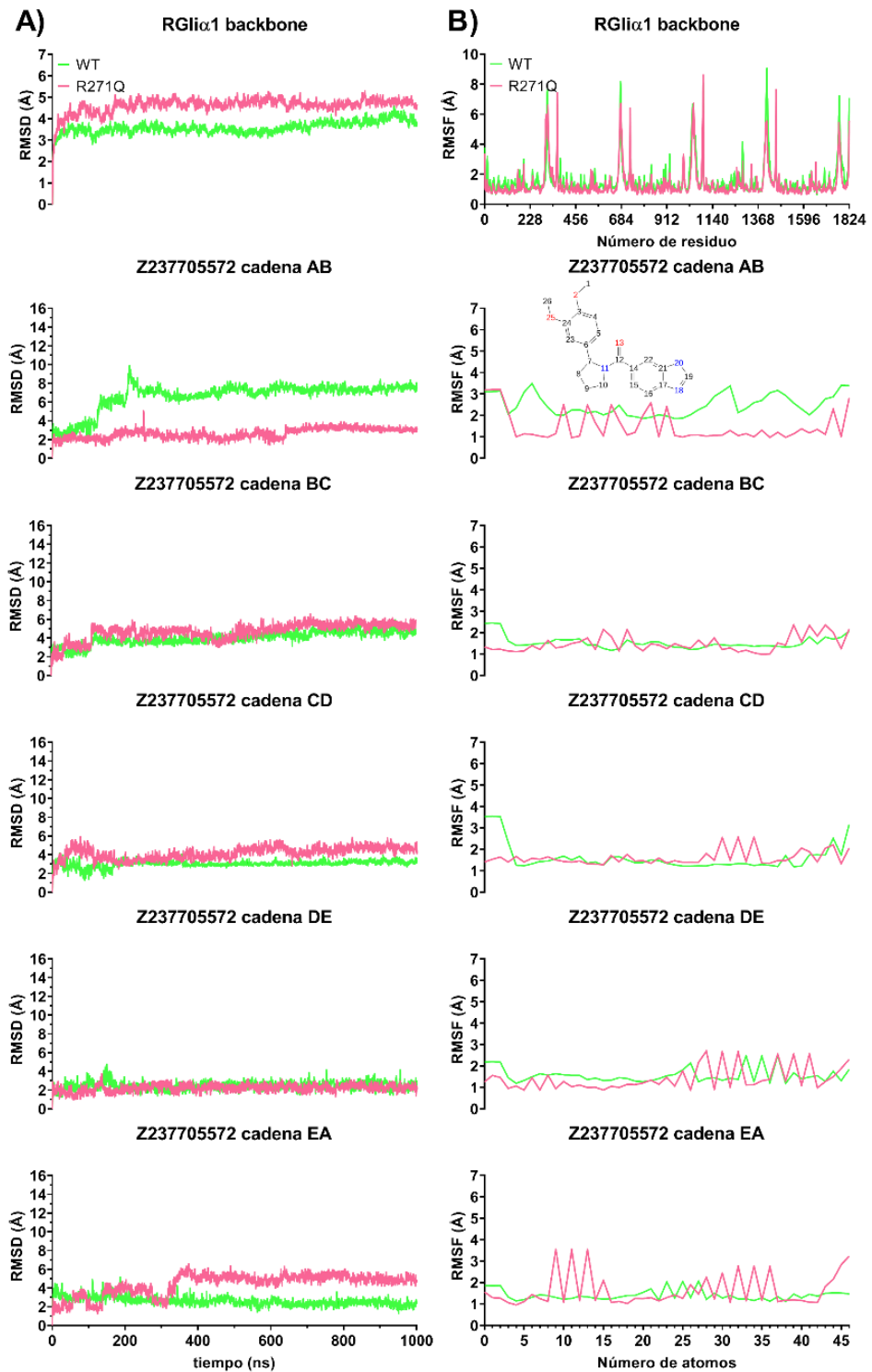
**Figura 23:** Evaluación electrofisiológica de la potenciación inducida por la molécula Z237705572 en RGLi $\alpha$ 1 WT y RGLi $\alpha$ 1 R271Q. Potenciación del RGLi $\alpha$ 1 WT y R271Q en presencia de Z237705572 a concentraciones crecientes (0.5, 5, 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) con glicina a 20  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Los datos se expresaron como media  $\pm$  SEM de 5 a 6 células y se realizó un análisis de ANOVA de dos vías \*\*\* P < 0.001, \*\* P 0.002 y \* P 0.033 frente al control.

#### **OE4.A4. Evaluación *in silico* de las moléculas más potenciales a partir de los registros electrofisiológicos.**

Las moléculas Z366057622 y Z237705572 fueron identificadas como las más prometedoras en los ensayos electrofisiológicos, por lo que se sometieron a

DMs en el RGlir1 WT y en la variante hiperekplexia para evaluar su estabilidad y comportamiento dentro de la cavidad de unión. El análisis de RMSD del *backbone* de la proteína evidenció una mayor estabilidad estructural en el WT en comparación con la mutante R271Q, donde se observaron valores de RMSD ligeramente más elevados en el complejo de Z366057622 (Figura 25A), en donde los RMSD del *backbone* del complejo con Z237705572 fueron casi similares (Figura 24A).

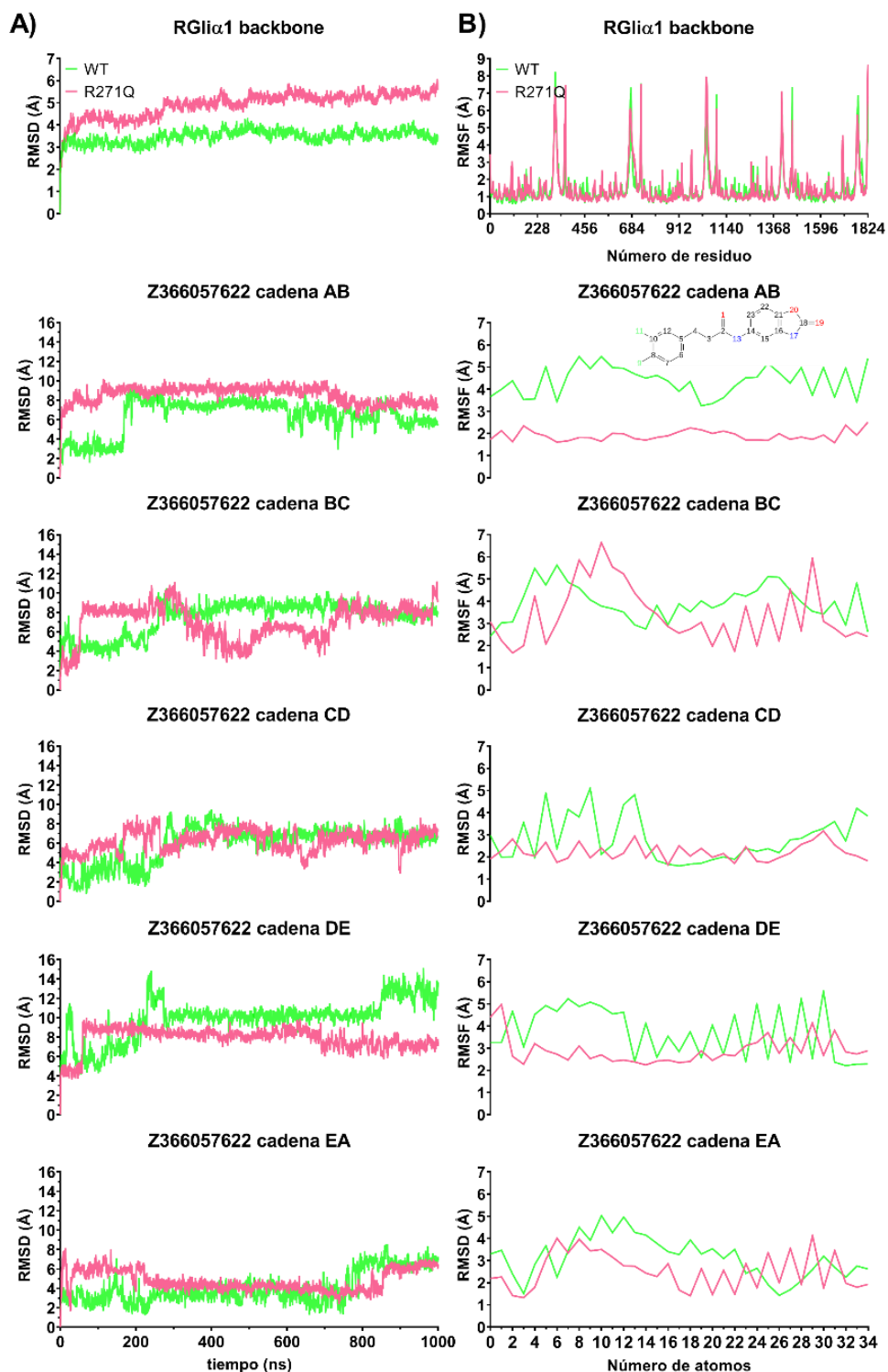
Con respecto al comportamiento de los ligandos, la molécula Z237705572 presentó un RMSD mayoritariamente inferior a 6 Å en todas las cavidades excepto en la cadena AB del WT, en donde alcanzó valores de 7 y 8 Å indicándonos un mayor grado de movilidad dentro del sitio de unión (Figura 24A). El análisis de RMSF, en la mayoría de los átomos exhibieron fluctuaciones en aproximada 2 Å, aunque en algunos átomos específicos presentaron una mayor flexibilidad (Figura 24B).



**Figura 24:** RMSD y RMSF del complejo RGlial1-Z237705572 en WT y mutante. A) Gráficas de RMSD del *backbone* de la proteína y las moléculas

de Z237705572 ancladas en las interfaces de las cadenas AB, BC, CD, DE y EA. B) Las gráficas de RMSF, muestran las fluctuaciones de los residuos del *backbone* de las proteínas y las moléculas de Z237705572.

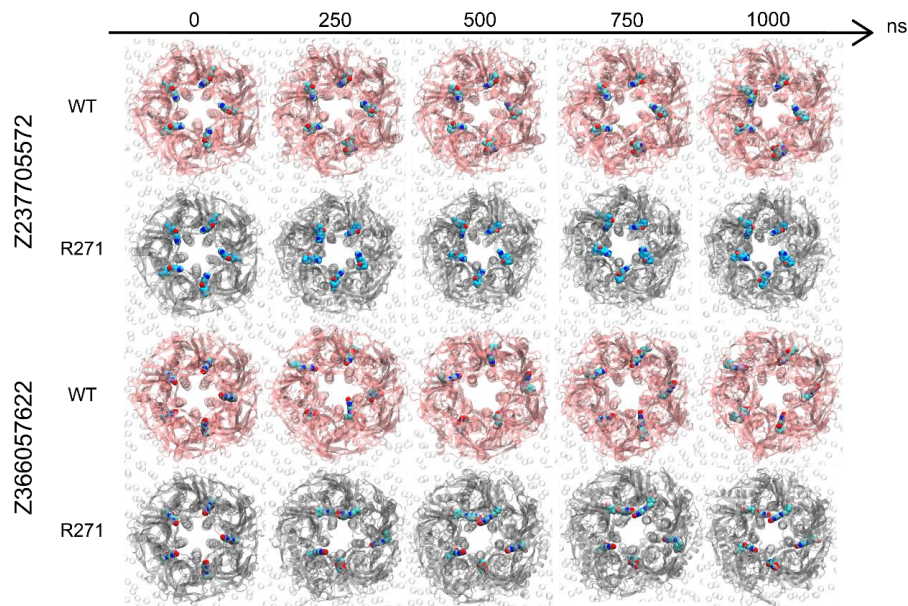
Por otro lado, el análisis de la molécula Z366057622 mostró que la mayoría de los valores de RMSD oscilaron entre 6 y 10 Å, lo que se evidenció que este ligando experimentó desplazamientos dentro de la cavidad (Figura 25A). Se observó una tendencia a la reubicación del ligando en dirección al poro (Figura 26), lo que podría explicar el aumento en los valores de RMSF, con fluctuaciones que alcanzaron los 6 Å en algunos átomos (Figura 25B).



**Figura 25:** RMSD y RMSF del complejo RGlial1-Z366057622 en WT y mutante. A) Gráficas de RMSD del *backbone* de la proteína y las moléculas

de Z366057622 ancladas en las interfaces de las cadenas AB, BC, CD, DE y EA. B) Las gráficas de RMSF, muestran las fluctuaciones de los residuos del *backbone* de las proteínas y las moléculas de Z366057622.

Durante las DMs, la molécula Z237705572 se mantuvo visualmente estable dentro de la cavidad de unión, tanto en el receptor RGl $\alpha$ 1 WT como en su variante mutante R271Q, lo que sugiere una buena afinidad y anclaje en ambas condiciones (Figura 26). En contraste, la molécula Z366057622 mostró en ambas variantes del receptor, una tendencia a desplazarse progresivamente hacia la región del poro, lo que podría estar asociado a un perfil de unión más dinámico o a una afinidad distinta por la cavidad original (Figura 26).

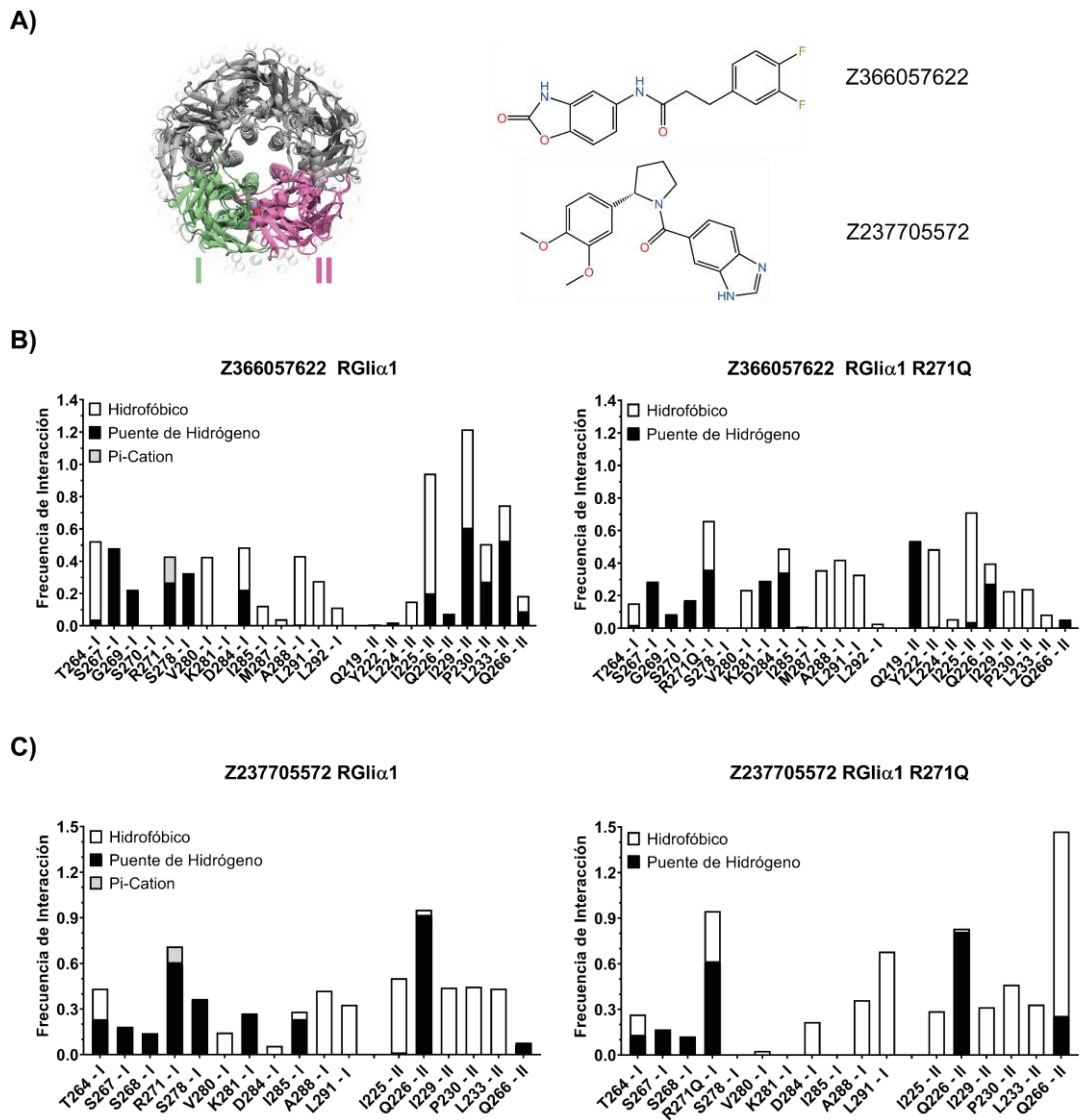


**Figura 26:** Comportamiento de las moléculas Z237705572 y Z366057622 en el sitio de unión del RGLi $\alpha$ 1 WT y R271Q durante 1000 ns de DMs.

El análisis de frecuencia de interacción presenta que ambas moléculas lograron interactuar con los residuos claves del sitio de unión, manteniendo contacto tanto con la forma WT como con la mutante R271Q (Figura 27). En los gráficos obtenidos del análisis de frecuencia de interacción, se puede notar que la molécula Z366057622, en el RGLi $\alpha$ 1 R271Q, mostró una menor frecuencia de interacción con algunos de los residuos que se consideran clave para la unión del propofol en comparación con el RGLi $\alpha$ 1 WT, como S267, R271, I229, I225 y L233 (Figura 27B). En lugar de esos contactos, la molécula estableció interacciones con otros residuos dentro de la misma cavidad, lo que sugiere un posible cambio en su orientación o anclaje. Además, se observó que esta molécula tendía a desplazarse hacia el poro del canal, lo que podría

tener implicancias en su modo de acción o en la forma en que estabiliza su unión con el receptor (Figura 24).

En las gráficas de frecuencia de interacción correspondientes a la molécula Z237705572, se observa un incremento general en la interacción con la mayoría de los residuos de la cavidad mutante, en comparación con lo registrado para Z366057622 (Figura 27B-C). Notablemente, Z237705572 presenta una mayor frecuencia de contacto con los residuos R271 y Q226 en WT y R217Q y Q226 en la mutante, lo que sugiere que podría estar estabilizando la unión como un puente estabilizador (Figura 27C).



**Figura 27:** Frecuencia de interacción de las moléculas Z366057622 y Z237705572 con los residuos de la cavidad del RGLiα1 WT y R271Q durante las DMs. A) Representación superior de la cavidad diferenciando las cadenas I y II. Además, se muestran las estructuras de las moléculas Z366057622 y Z237705572. B y C) Distribución de la frecuencia de interacción de los residuos de cada cadena. El análisis se realizó con el promedio de las 5 moléculas por complejo.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la viabilidad de utilizar enfoques computacionales integrados con validación experimental para identificar moduladores alostéricos del RGl $\alpha$ 1 mutante hiperekplexica. La metodología empleada que combinó el diseño *de novo*, cribado virtual, *docking* molecular, dinámicas moleculares y ensayos electrofisiológicos, nos permitió identificar moléculas con potencial terapéutico como Z237705572 y Z366057622, que mostraron una potenciación significativa del receptor mutante. El hecho de que estas moléculas lograran inducir una respuesta significativa en el canal mutado respalda la hipótesis de que la cavidad identificada *in silico* constituye un sitio viable para la intervención farmacológica. Estos hallazgos se alinean con estudios previos que han utilizado estrategias similares para el diseño de moduladores de canales iónicos, aunque también revelan desafíos y oportunidades para futuras investigaciones.<sup>24,26</sup>

El uso de herramientas computacionales como E-LEA3D para el diseño *de novo* ha sido validado en trabajos previos. Por ejemplo, Douguet y colaboradores emplearon este enfoque para generar inhibidores de la timidina monofosfato quinasa, identificando compuestos con alta afinidad y selectividad, lo que respalda la eficacia de esta estrategia en el descubrimiento de ligandos novedosos<sup>35</sup>. En nuestro caso, el diseño basado en fragmentos derivados del fenol (*core* del propofol) permitió generar

moléculas con perfiles estructurales diversificados (Figura 13), optimizadas mediante cribado virtual.

El cribado basado en similitud estructural y *docking* molecular ha sido ampliamente utilizado en la identificación de moduladores de receptores. Un ejemplo, es Shen y colaboradores quienes identificaron inhibidores de receptor transitorio 5 mediante un flujo de trabajo similar, reduciendo millones de compuestos a candidatos viables mediante filtros secuenciales (HTVS, SP y XP)<sup>63-65</sup>. En nuestro estudio, este enfoque permitió seleccionar 11 moléculas de una base de datos de 14 millones, destacando la eficiencia del método (Tabla 4). Además, la validación mediante MM-GBSA para predecir energías de unión coincide con trabajos como el de Jangid y colaboradores, quienes demostraron que este método mejora la presión en la selección de ligandos al considerar efectos entálpicos y entrópicos<sup>65</sup>.

Los ensayos electrofisiológicos confirmaron que Z237705572 induce una potenciación ~300% en el receptor mutante (Figura 23), superando al RGl $\alpha$ 1 WT (215%). Este efecto, aunque menor al del propofol (~500-600%)<sup>66</sup>, sugiere un mecanismo de acción distinto, posiblemente mediado por interacciones más específicas con residuos que pertenecen al sitio alostérico. Resultados similares se han reportado que mutaciones en los residuos S267 y A288 alteraron la afinidad del propofol, resaltando la importancia de estos residuos en la modulación<sup>30,31</sup>. En nuestro estudio, ambas moléculas (Z237705572 y

Z366057622), mostraron una frecuencia de interacción menor a 0.5 (Figura 27). No obstante, se observaron interacciones relevantes tanto de tipo hidrofóbicas como mediante la formación de puentes de hidrógenos, lo que sugiere un anclaje estable con la molécula Z237705572 dentro de la cavidad a pesar de su frecuencia de contacto relativamente baja. Estos tipos de interacciones, aunque son menos frecuentes podrían contribuir a la afinidad y especificidad de las moléculas hacia el receptor. Sin embargo, estas moléculas mostraron una mayor estabilidad en la interacción con los residuos R271 y R271Q, en comparación con el propofol. Además, estas moléculas presentan interacciones más fuertes, como puentes de hidrógenos y enlaces  $\pi$ -catión mientras que el propofol predominan las interacciones más hidrofóbicas.

Este proyecto propone una estrategia racional para la identificación de nuevos moduladores alostéricos positivos de RGl $\alpha$ 1 R271Q. Aunque los compuestos identificados no superaron la eficacia del propofol, representan una base para el desarrollo de fármacos más específicos y efectivos para un blanco terapéutico. Además, la evaluación de solo 6 moléculas en ensayos electrofisiológicos limitó la exploración de candidatos prometedores, lo que restringe el alcance del análisis y la posibilidad de identificar otros candidatos con alto potencial modulador. La ampliación de este análisis, junto con estudios de toxicidad *in vitro* y análisis de selectividad frente a otros receptores (por ejemplo, RGABA<sub>A</sub>), resulta esencial para validar la especificidad de

acción y reducir el riesgo de efectos adversos. Estos pasos son fundamentales para la eventual transición hacia estudios *in vivo* o para la optimización de las moléculas.

Si bien aún es necesario realizar ensayos adicionales para determinar la selectividad de los compuestos, también resulta fundamental evaluar las demás moléculas candidatas directamente sobre el receptor mutante RGl $\alpha$ 1 R271Q, ya que solo una fracción de ellas fue probada funcionalmente. Además, se requiere aumentar el número de réplicas en los ensayos electrofisiológicos para lograr una validación más robusta y estadísticamente confiable de los resultados observados. Con los resultados obtenidos nos proporcionan una base para futuras optimizaciones estructurales. La modificación racional de estas moléculas podría conducir al desarrollo de compuestos con mayor potencia y especificidad hacia el receptor de glicina y así lograr acercarnos a una posible alternativa terapéutica para la Hiperekplexia.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten concluir que el protocolo utilizado en este estudio representa una estrategia efectiva para el desarrollo, búsqueda o reposicionamiento de moléculas dirigidas a un objetivo terapéutico. La combinación de herramientas *in silico*, como el diseño *de novo*, el cribado virtual y la selección de compuestos, nos permitió acotar el universo químico a candidatos con un potencial bioactivo a la proteína objetivo, optimizando significativamente el uso de tiempo y recursos frente a enfoques tradicionales.

Un hallazgo relevante es que las moléculas evaluadas en los ensayos electrofisiológicos no correspondieron a los compuestos diseñados *de novo*, sino a las moléculas estructuralmente similares identificadas mediante cribado virtual. Este resultado no solo valida la eficacia del enfoque computacional, sino que también sugiere que los compuestos diseñados podrían tener un efecto potenciador sobre RGlir1 WT e hiperekplexica, lo que abre a nuevas posibilidades para su optimización y validación experimental. La implementación de un enfoque *in silico* ha permitido una optimización significativa en términos de tiempo y recursos, lo que evidencia su aplicación no solo en el estudio del receptor de glicina, sino que también en la identificación de moduladores para otras proteínas terapéuticas relevantes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bhidayasiri R, Truong DD. Startle syndromes. *Handb Clin Neurol*. 2011;100:421-430. doi:10.1016/B978-0-444-52014-2.00032-X
2. Saini AG, Pandey S. Hyperekplexia and other startle syndromes. *J Neurol Sci*. 2020;416. doi:10.1016/j.jns.2020.117051
3. Bakker MJ, van Dijk JG, van den Maagdenberg AM, Tijssen MA. Startle syndromes. *Lancet Neurol*. 2006;5(6):513-524. doi:10.1016/S1474-4422(06)70470-7
4. Kirstein L, Silfverskiöld BP. A FAMILY WITH EMOTIONALLY PRECIPITATED "DROP SEIZURES." *Acta Psychiatr Scand*. 1958;33(4):471-476. doi:10.1111/J.1600-0447.1958.TB03533.X
5. Suhren O, Bruyn GW, Tuynman JA. Hyperexplexia. A hereditary startle syndrome. *J Neurol Sci*. 1966;3(6):577-605. doi:10.1016/0022-510X(66)90047-5
6. Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Hahn AF, O'Connell P, Wasmuth JJ. Mutations in the  $\alpha 1$  subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nature Genetics* 1993 5:4. 1993;5(4):351-358. doi:10.1038/ng1293-351
7. Zhan F xia, Wang SG, Cao L. Advances in hyperekplexia and other startle syndromes. *Neurological Sciences*. 2021;42(10):4095-4107. doi:10.1007/S10072-021-05493-8/TABLES/2
8. Bode A, Lynch JW. Analysis of Hyperekplexia Mutations Identifies Transmembrane Domain Rearrangements That Mediate Glycine Receptor Activation. *J Biol Chem*. 2013;288(47):33760. doi:10.1074/JBC.M113.513804
9. Burgos CF, Yévenes GE, Aguayo LG. Structure and Pharmacologic Modulation of Inhibitory Glycine Receptors. *Mol Pharmacol*. 2016;90(3):318. doi:10.1124/MOL.116.105726
10. Schaefer N, Vogel N, Villmann C. Glycine receptor mutants of the mouse: What are possible routes of inhibitory compensation? *Front Mol Neurosci*. 2012;5(OCTOBER 2012):33967. doi:10.3389/FNMOL.2012.00098/BIBTEX
11. Eulenburg V, Hülsmann S. Synergistic Control of Transmitter Turnover at Glycinergic Synapses by GlyT1, GlyT2, and ASC-1. *International*

12. Schaefer N, Harvey RJ, Villmann C. Startle Disease: New Molecular Insights into an Old Neurological Disorder. *Neuroscientist*. 2023;29(6):767-781.  
doi:10.1177/10738584221104724/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_10738584221104724-FIG3.JPEG
13. Maguire EP, Mitchell EA, Greig SJ, et al. Extrasynaptic glycine receptors of rodent dorsal raphe serotonergic neurons: a sensitive target for ethanol. *Neuropsychopharmacology*. 2013;39(5):1232-1244.  
doi:10.1038/NPP.2013.326
14. Yu H, Bai XC, Wang W. Characterization of the subunit composition and structure of adult human glycine receptors. *Neuron*. 2021;109(17):2707-2716.e6. doi:10.1016/j.neuron.2021.08.019
15. Low SE, Ito D, Hirata H. Characterization of the Zebrafish Glycine Receptor Family Reveals Insights Into Glycine Receptor Structure Function and Stoichiometry. *Front Mol Neurosci*. 2018;11.  
doi:10.3389/FNMOL.2018.00286/FULL
16. Du J, Lü W, Wu S, Cheng Y, Gouaux E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature*. 2015;526(7572):224-229. doi:10.1038/NATURE14853
17. Huang X, Chen H, Michelsen K, Schneider S, Shaffer PL. Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$  bound to antagonist strychnine. *Nature* 2015 526:7572. 2015;526(7572):277-280.  
doi:10.1038/nature14972
18. Gibbs E, Klemm E, Seiferth D, et al. Conformational transitions and allosteric modulation in a heteromeric glycine receptor. *Nature Communications* 2023 14:1. 2023;14(1):1-15. doi:10.1038/s41467-023-37106-7
19. Yan J, Chen L, Warshel A, Bai C. Exploring the Activation Process of the Glycine Receptor. *J Am Chem Soc*. 2024;146(38):26297-26312.  
doi:10.1021/JACS.4C08489
20. Kumar A, Basak S, Rao S, et al. Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in lipid nanodiscs. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/S41467-020-17364-5

21. Bode A, Lynch JW. Analysis of Hyperekplexia Mutations Identifies Transmembrane Domain Rearrangements That Mediate Glycine Receptor Activation. *J Biol Chem.* 2013;288(47):33760. doi:10.1074/JBC.M113.513804
22. Calimet N, Simoes M, Changeux JP, Karplus M, Taly A, Cecchini M. A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(42):E3987. doi:10.1073/PNAS.1313785110/-/DCSUPPLEMENTAL
23. Zhan F xia, Wang SG, Cao L. Advances in hyperekplexia and other startle syndromes. *Neurological Sciences.* 2021;42(10):4095-4107. doi:10.1007/S10072-021-05493-8/TABLES/2
24. Chung SK, Vanbellinthen JF, Mullins JGL, et al. Pathophysiological Mechanisms of Dominant and Recessive GLRA1 Mutations in Hyperekplexia. *The Journal of Neuroscience.* 2010;30(28):9612. doi:10.1523/JNEUROSCI.1763-10.2010
25. Shan Q, Han L, Lynch JW. Function of hyperekplexia-causing  $\alpha$ 1R271Q/L glycine receptors is restored by shifting the affected residue out of the allosteric signalling pathway. *Br J Pharmacol.* 2012;165(7):2113-2123. doi:10.1111/J.1476-5381.2011.01701.X
26. O'Shea SM, Becker L, Weiher H, Betz H, Laube B. Propofol Restores the Function of "Hyperekplexic" Mutant Glycine Receptors in *Xenopus* Oocytes and Mice. *The Journal of Neuroscience.* 2004;24(9):2322. doi:10.1523/JNEUROSCI.4675-03.2004
27. Bode A, Lynch JW. The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain.* 2014;7(1):1-12. doi:10.1186/1756-6606-7-2/TABLES/2
28. Schaefer N, Langlhofer G, Kluck CJ, Villmann C. Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia. *Br J Pharmacol.* 2013;170(5):933. doi:10.1111/BPH.12335
29. Thomas RH, Chung SK, Wood SE, et al. Genotype-phenotype correlations in hyperekplexia: apnoeas, learning difficulties and speech delay. *Brain.* 2013;136(10):3085-3095. doi:10.1093/BRAIN/AWT207
30. Moraga-Cid G, Yevenes GE, Schmalzing G, Peoples RW, Aguayo LG. A Single Phenylalanine Residue in the Main Intracellular Loop of  $\alpha$ 1  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A and Glycine Receptors Influences Their

- Sensitivity to Propofol. *Anesthesiology*. 2011;115(3):464-473. doi:10.1097/ALN.0B013E31822550F7
31. Ahrens J, Leuwer M, Stachura S, et al. A transmembrane residue influences the interaction of propofol with the strychnine-sensitive glycine  $\alpha 1$  and  $\alpha 1\beta$  receptor. *Anesth Analg*. 2008;107(6):1875-1883. doi:10.1213/ANE.0B013E3181875A31
  32. Vemula D, Jayasurya P, Sushmitha V, Kumar YN, Bhandari V. CADD, AI and ML in drug discovery: A comprehensive review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;181:106324. doi:10.1016/J.EJPS.2022.106324
  33. Llorach-Pares L, Nonell-Canals A, Avila C, Sanchez-Martinez M. Computer-Aided Drug Design (CADD) to De-Orphanize Marine Molecules: Finding Potential Therapeutic Agents for Neurodegenerative and Cardiovascular Diseases. *Mar Drugs*. 2022;20(1):53. doi:10.3390/MD20010053/S1
  34. Maiti NJ, Singh NK. CADD Approaches in Anti-inflammatory Drug Discovery. Published online 2023:335-354. doi:10.1007/978-981-99-1316-9\_14
  35. Douguet D. e-LEA3D: a computational-aided drug design web server. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(suppl\_2):W615-W621. doi:10.1093/NAR/GKQ322
  36. Shaker B, Ahmad S, Lee J, Jung C, Na D. In silico methods and tools for drug discovery. *Comput Biol Med*. 2021;137:104851. doi:10.1016/J.COMPBIOMED.2021.104851
  37. Meyers J, Fabian B, Brown N. De novo molecular design and generative models. *Drug Discov Today*. 2021;26(11):2707-2715. doi:10.1016/J.DRUDIS.2021.05.019
  38. Wlodawer A, Vondrasek J. Inhibitors of HIV-1 protease: A major success of structure-assisted drug design. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1998;27(Volume 27, 1998):249-284. doi:10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.27.1.249/CITE/REFWORKS
  39. HOLE documentation. Accessed January 21, 2025. <https://www.holeprogram.org/doc/>
  40. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14(1):33-38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5

41. Smart OS, Neduvélil JG, Wang X, Wallace BA, Sansom MSP. HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J Mol Graph.* 1996;14(6):354-360. doi:10.1016/S0263-7855(97)00009-X
42. Mutating Residues. Accessed January 21, 2025. [https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/maestro/maestro\\_user\\_manual/mutating\\_residues.html?Highlight=mutations%20residue](https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/maestro/maestro_user_manual/mutating_residues.html?Highlight=mutations%20residue)
43. Schrödinger Release 2025-2 : Maestro, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2025. Accessed July 3, 2025. <https://www.schrodinger.com/citations/>
44. What procedure do I follow if I want to mutate amino acid residues? Accessed January 18, 2025. <https://support.schrodinger.com/s/article/733>
45. FPocketWeb. Accessed January 21, 2025. <https://durrantlab.pitt.edu/fpocketweb/>
46. Le Guilloux V, Schmidtke P, Tuffery P. Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics.* 2009;10. doi:10.1186/1471-2105-10-168
47. Introducción a la preparación y visualización de estructuras. Accessed January 20, 2025. [https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/tutorials/visualization\\_preparation/visualization\\_preparation.htm?tocpath=Small%20Molecule%20Drug%20Discovery%7CTutorials%7CTarget%20Validation%20%2526%20Structural%20Enablement%7C\\_\\_\\_\\_\\_12](https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/tutorials/visualization_preparation/visualization_preparation.htm?tocpath=Small%20Molecule%20Drug%20Discovery%7CTutorials%7CTarget%20Validation%20%2526%20Structural%20Enablement%7C_____12)
48. Kim MO, Nichols SE, Wang Y, McCammon JA. Effects of histidine protonation and rotameric states on virtual screening of M. tuberculosis RmlC. *J Comput Aided Mol Des.* 2013;27(3):235-246. doi:10.1007/S10822-013-9643-9
49. Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W443-W447. doi:10.1093/NAR/GKV315
50. Introducción al análisis de trayectoria MD con Desmond. Accessed January 20, 2025.

[https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/tutorials/desmond\\_trj\\_analysis/desmond\\_trj\\_analysis.htm](https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/tutorials/desmond_trj_analysis/desmond_trj_analysis.htm)

51. Prism - GraphPad. Accessed January 20, 2025. <https://www.graphpad.com/features>
52. Drug Design or Screen. Accessed January 21, 2025. <https://chemoinfo.ipmc.cnrs.fr/LEA3D/index.html>
53. Douguet D, Munier-Lehmann H, Labesse G, Pochet S. LEA3D: A computer-aided ligand design for structure-based drug design. *J Med Chem*. 2005;48(7):2457-2468. doi:10.1021/JM0492296
54. Sastry GM, Dixon SL, Sherman W. Rapid shape-based ligand alignment and virtual screening method based on atom/feature-pair similarities and volume overlap scoring. *J Chem Inf Model*. 2011;51(10):2455-2466. doi:10.1021/CI2002704
55. Modeling Receptor Binding in an Olfactory Protein. Accessed March 4, 2025. [https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/tutorials/olfactory\\_receptor\\_binding/olfactory\\_receptor\\_binding.htm](https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/tutorials/olfactory_receptor_binding/olfactory_receptor_binding.htm)
56. Re-scoring Docked Ligands with MM-GBSA. Accessed April 9, 2025. [https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/tutorials/mmgbsa\\_rescore/mmgbsa\\_rescore.htm](https://learn.schrodinger.com/private/edu/release/current/Documentation/html/tutorials/mmgbsa_rescore/mmgbsa_rescore.htm)
57. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/srep42717
58. Li B, Wang Z, Liu Z, et al. DrugMetric: quantitative drug-likeness scoring based on chemical space distance. *Brief Bioinform*. 2024;25(4):321. doi:10.1093/BIB/BBAE321
59. Yu J, Zhu H, Lape R, et al. Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor. *Cell*. 2021;184(4):957-968.e21. doi:10.1016/J.CELL.2021.01.026
60. Moraga-Cid G, Yevenes GE, Schmalzing G, Peoples RW, Aguayo LG. A single phenylalanine residue in the main intracellular loop of  $\alpha 1$   $\gamma$ -aminobutyric acid type a and glycine receptors influences their sensitivity to propofol. *Anesthesiology*. 2011;115(3):464-473. doi:10.1097/ALN.0B013E31822550F7

61. Sanapalli BKR, Yele V, Baldaniya L, Karri VVSR. Identification of novel protein kinase C- $\beta$ II inhibitors: virtual screening, molecular docking and molecular dynamics simulation studies. *J Mol Model*. 2022;28(5):1-11. doi:10.1007/S00894-022-05104-Z/FIGURES/6
62. Zhu J, Cheng D, Zhang W, Song C, Chen J, Pei T. A New Approach to Measuring the Similarity of Indoor Semantic Trajectories. *ISPRS International Journal of Geo-Information* 2021, Vol 10, Page 90. 2021;10(2):90. doi:10.3390/IJGI10020090
63. Shen M, Li L, Li Y, et al. Discovery of potential novel TRPC5 inhibitors by virtual screening and bioassay. *Bioorg Med Chem*. 2023;94:117477. doi:10.1016/J.BMC.2023.117477
64. Gomaa MS, Alturki MS, Tawfeeq N, et al. Discovery of Non-Peptide GLP-1 Positive Allosteric Modulators from Natural Products: Virtual Screening, Molecular Dynamics, ADMET Profiling, Repurposing, and Chemical Scaffolds Identification. *Pharmaceutics*. 2024;16(12):1607. doi:10.3390/PHARMACEUTICS16121607/S1
65. Jangid K, Devi B, Sahoo A, et al. Virtual screening and molecular dynamics simulation approach for the identification of potential multi-target directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *J Biomol Struct Dyn*. 2024;42(1):509-527. doi:10.1080/07391102.2023.2201838
66. Nguyen HT, Li KY, Dagraca RL, Delphin E, Xiong M, Ye JH. Behavior and cellular evidence for propofol-induced hypnosis involving brain glycine receptors. *Anesthesiology*. 2009;110(2):326-332. doi:10.1097/ALN.0B013E3181942B5B