



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Magíster en Bioquímica y Bioinformática**

**DESARROLLO DE SULFONAMIDAS COMO MODULADORES ALOSTÉRICOS
POSITIVOS DEL RECEPTOR DE GLICINA $\alpha 3$ FOSFORILADO: UNA
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA POTENCIAL PARA EL TRATAMIENTO DEL
DOLOR CRÓNICO**

POR: LAURA CRISTINA PACHECO PATERNINA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

Profesor guía: Dr. David Mauricio Ramírez Sánchez
Profesor co-guía: Dr. Gustavo Moraga Cid
Profesor co-guía: Dr. Jhon Jairo López Villa

Marzo, 2025
Concepción, Chile

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

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino, he contado con el apoyo invaluable de muchas personas, sin quienes este trabajo no habría sido posible. A Jorge, mi pareja y compañero de vida, por su amor y apoyo constante. Por estar a mi lado en cada desafío y por su sacrificio para que pudiera culminar este proceso con éxito. A mis padres, mi tía Diana y mi hermana Daniela, por su amor, su apoyo inquebrantable y por motivarme siempre incluso en los días más difíciles. A mis amigos, quienes, sin importar la distancia o el tiempo, han estado siempre presentes. Gracias por cada palabra de aliento. A mi tutor, David, por confiar en mi desde el primer día y acompañarme en todo este proceso. Su guía y la calidez de su familia hicieron que este camino fuera más llevadero. A mi co-tutor, Gustavo, por su paciencia, apoyo y por darme la confianza para seguir adelante. A mi co-tutor, Jhon, por sus enseñanzas, por su orientación y por ayudarme a consolidar mis conocimientos con su experiencia. A la Universidad de Concepción, por abrirme sus puertas y brindarme un espacio para crecer. Al cuerpo docente y administrativo, a mis compañeros de laboratorio y a quienes forman parte del comedor universitario, gracias por su apoyo, compañía y calidez. A Sumi, por haber sido mi compañera incondicional, por llenar mis días de ternura y por recordarme, incluso en la distancia, que la energía y el amor que nos acompañan nunca desaparecen. A los proyectos Fondecyt 1220656 y 1211095, por brindar el apoyo necesario para que esta investigación pudiera llevarse a cabo. A todas las personas que conocí en este proceso, por cada enseñanza, cada gesto de apoyo y cada momento compartido.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUCCIÓN	12
1.1 DOLOR CRÓNICO.....	12
1.2 RECEPTORES DE GLICINA.....	13
1.3 LOS RECEPTORES DE GLICINA GLYRA3 Y SU RELEVANCIA EN EL DOLOR CRÓNICO	16
1.4 EFECTO DE LAS MUTACIONES FOSFOMIMÉTICAS EN GLYRA3	19
1.5 MODULADORES ALOSTÉRICOS POSITIVOS DEL RECEPTOR DE GLICINA.....	21
1.6 SULFONAMIDAS.....	23
2 HIPÓTESIS.....	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28

3.2.1	OE1: Diseñar computacionalmente derivados de sulfonamidas basados en núcleos de tetrahydroquinolinas.	28
3.2.2	OE2: Caracterizar el modo de unión de los derivados de sulfonamidas con anillos de tetrahydroquinolinas mediante simulaciones de dinámica molecular...	28
3.2.3	OE3: Evaluar la actividad biológica de las sulfonamidas diseñadas mediante registros electrofisiológicos del receptor de glicina $\alpha 3$ que porta una mutación fosfomimética.	28
4	METODOLOGÍA	29
4.1	OE1: DISEÑAR COMPUTACIONALMENTE DERIVADOS DE SULFONAMIDAS BASADOS EN NÚCLEOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS	29
4.1.1	Comparación del sitio de unión de AM-3607 entre GlyRa1 y GlyRa3	29
4.1.2	Diseño computacional de derivados de sulfonamidas con anillos de THQ	31
4.2	OE2: CARACTERIZAR EL MODO DE UNIÓN DE LOS DERIVADOS DE SULFONAMIDAS CON ANILLOS DE TETRAHIDROQUINOLINA MEDIANTE SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.	35
4.2.1	Preparación de sistemas para simulaciones de Dinámica Molecular (DM)	35
4.2.2	Simulaciones de dinámica molecular de equilibrio	37
4.2.3	Simulaciones de dinámica molecular de producción	38
4.2.4	Análisis de simulaciones de dinámica molecular	38
4.3	OE3: DETERMINAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS SULFONAMIDAS DISEÑADAS MEDIANTE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS DEL RECEPTOR DE GLICINA $\alpha 3$ FOSFORILADO.	39

4.3.1	Cultivo, transfección y expresión de GlyR α 3 WT y S346E	39
4.3.2	Preparación de soluciones y electrodos para registros electrofisiológicos	42
4.3.3	Evaluación de corrientes y moléculas prometedoras	43
5	RESULTADOS	45
5.1	OE1: DISEÑAR COMPUTACIONALMENTE DERIVADOS DE SULFONAMIDAS BASADOS EN NÚCLEOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS	45
5.1.1	Comparación del sitio de unión de AM-3607 entre GlyR α 1 y GlyR α 3	45
5.1.2	Diseño computacional de derivados de sulfonamidas con anillos de THQs	54
5.2	OE2: CARACTERIZAR EL MODO DE UNIÓN DE LOS DERIVADOS DE SULFONAMIDAS CON ANILLOS DE ANILLOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS MEDIANTE SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.....	69
5.2.1	Análisis de dinámica molecular y estabilidad conformacional de GlyR α 3 en complejo con AM-3607, JL-02 y CO2-1	69
5.2.2	Interacciones moleculares de AM-3607, JL-02 y CO2-1 en el sitio alostérico de GlyR α 3.....	73
5.3	OE3: EVALUAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS SULFONAMIDAS DISEÑADAS MEDIANTE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS DEL RECEPTOR DE GLICINA A3 FOSFORILADO	77
5.3.1	Evaluación electrofisiológica de los derivados de sulfonamidas sintetizadas en GlyR α 3.....	77

5.3.2	Caracterización electrofisiológica del receptor GlyR α 3 en presencia de glicina	79
5.3.3	Análisis electrofisiológico preliminar de las sulfonamidas con anillos de THQ sintetizadas en GlyR α 3-WT	81
5.3.4	Evaluación electrofisiológica de JL-02 en GlyR α 3 WT y S346E.....	84
5.3.5	Evaluación electrofisiológica de CO2-1 en GlyR α 3-WT y GlyR α 3-S346E86	
6	DISCUSIÓN	90
7	CONCLUSIONES	95
8	BIBLIOGRAFÍA	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sulfonamidas con anillos de THQ identificadas con mayor estabilidad de unión a GlyR α 3	60
Tabla 2. Sulfonamidas con anillos de THQ derivadas del core 2 con mayor estabilidad de unión a GlyR α 3.....	66
Tabla 3. Sulfonamidas con anillos de THQ sintetizadas y sus parámetros energéticos.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de GlyR α 3 y su interacción con glicina.	15
Figura 2. Mecanismo de regulación de la actividad de GlyR α 3.	18
Figura 3. Sitios de unión de los MAPs reportados para GlyR.	22
Figura 4. Estructura cristalográfica de GlyR α 3 en complejo con glicina y AM-3607. .	25
Figura 5. Representación esquemática del receptor GlyR α 3 mostrando la ubicación específica de la mutación fosfomimética S346E.	41
Figura 6. Alineamiento de secuencias de GlyR α 1 y GlyR α 3.	47
Figura 7. Sitio de unión alostérico de AM-3607 en GlyR α 3.	49
Figura 8. Sitio de unión alostérico de AM-3607 en GlyR α 3.	51
Figura 9. Representación comparativa de los residuos que forman el sitio de unión de AM-3607 en GlyR α 1 y GlyR α 3.	53
Figura 10. Diseño de núcleos de sulfonamidas con anillos de THQ) y sus grupos R.	55
Figura 11. Distribución de la energía libre de unión (Δ GBind) de las sulfonamidas generadas por núcleo estructural.	57
Figura 12. Evaluación energética de los derivados de sulfonamidas con anillos de THQ con mejor estabilidad en el sitio alostérico de GlyR α 3.	59
Figura 13. Optimización de las posiciones y sustituyentes en los grupos R de los cores 2 y 4 para la generación de la quimioteca complementaria.	63
Figura 14. Evaluación energética de las sulfonamidas con anillos de THQ derivadas de los cores 2 y 4 tras las modificaciones estructurales.	65
Figura 15. Representaciones estructurales y RMSD de GlyR α 3 en complejo con AM-3607, JL-02 y CO2-1.	70
Figura 16. Frecuencia de interacciones entre los ligandos AM-3607, JL-02 y CO2-1 con GlyR α 3.	74
Figura 17. Curvas dosis-respuesta de GlyR α 3-WT y GlyR α 3-S346E en presencia de glicina.	79
Figura 18. Evaluación funcional preliminar de las sulfonamidas sintetizadas en GlyR α 3-WT.	82
Figura 19. Evaluación electrofisiológica de JL-02 en GlyR α 3-WT y S346E.	84
Figura 20. Evaluación electrofisiológica de CO2-1 en GlyR α 3 WT y S346E.	87

RESUMEN

La modulación de los receptores de glicina ha surgido como una estrategia prometedora para el desarrollo de alternativas terapéuticas más seguras y efectivas para tratar el dolor crónico. En este estudio, se evaluó el potencial de sulfonamidas con anillos de tetrahydroquinolina (THQ) fusionadas como moduladores alostéricos positivos (MAPs) del receptor de glicina $\alpha 3$ (GlyR $\alpha 3$). La fosforilación de GlyR $\alpha 3$ en la serina 346, mediada por la proteína quinasa A (PKA), inhibe las corrientes glicinérgicas y contribuye a la sensibilización al dolor. Para revertir este efecto, se diseñaron y evaluaron computacionalmente derivados de sulfonamidas con anillos de THQ. Mediante simulaciones de dinámica molecular y cálculos de energía libre de unión (ΔG_{Bind}), se seleccionaron los compuestos con mayor estabilidad y afinidad por GlyR $\alpha 3$. Posteriormente, registros electrofisiológicos permitieron evaluar su capacidad para modular las corrientes glicinérgicas en GlyR $\alpha 3$ wild-type y en su mutante fosfomimética S346E. Los resultados mostraron que JL-02 y CO2-1 presentan interacciones estables con el sitio alostérico de GlyR $\alpha 3$, con mejoras en estabilidad y especificidad respecto a AM-3607. En particular, CO2-1 exhibió una potenciación significativa de las corrientes glicinérgicas en GlyR $\alpha 3$ S346E, consolidándolo como un candidato prometedor para el desarrollo de nuevas terapias. Este estudio proporciona una base sólida para el desarrollo de nuevos moduladores alostéricos dirigidos a GlyR $\alpha 3$ fosforilado con potencial aplicación en el tratamiento del dolor crónico.

ABSTRACT

Glycine receptor modulation has emerged as a promising strategy for developing safer and more effective therapeutic alternatives for chronic pain treatment. This study evaluated the potential of sulfonamides containing tetrahydroquinoline rings as positive allosteric modulators (PAMs) of the glycine receptor $\alpha 3$ (GlyR $\alpha 3$). Phosphorylation of GlyR $\alpha 3$ at serine 346, mediated by protein kinase A (PKA), inhibits glycinergic currents and contributes to pain sensitization. To counteract this effect, sulfonamide derivatives with tetrahydroquinoline (THQs) rings for GlyR $\alpha 3$ were computationally designed and evaluated. Through molecular dynamics simulations and binding free energy (ΔG_{Bind}) calculations, the most stable and high-affinity compounds were selected. Subsequently, electrophysiological recordings were used to assess their ability to modulate glycinergic currents in both wild-type GlyR $\alpha 3$ and its phosphomimetic mutant S346E. The results demonstrated that JL-02 and CO2-1 establish stable interactions with GlyR $\alpha 3$, exhibiting improved stability and specificity compared to AM-3607. Notably, CO2-1 significantly enhanced glycinergic currents in GlyR $\alpha 3$ S346E, positioning it as a promising candidate for novel pain therapies. This study provides a strong foundation for the development of allosteric modulators targeting phosphorylated GlyR $\alpha 3$, with potential applications in chronic pain treatment.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Dolor crónico

El dolor crónico se define como un dolor que dure más de tres meses (Lawrence et al., 2023). Se caracteriza por tener una alta prevalencia, la cual varía entre países y regiones de ingresos medios y bajos, donde afecta entre el 33% y el 56% de los adultos (Goldberg & McGee, 2011; Zimmer et al., 2022). Puede ser causado por una variedad de factores que incluyen lesiones y enfermedades como dolor lumbar bajo, osteoartritis, artritis reumatoide, migraña, síndrome del túnel carpiano, fibromialgia, entre otras causas, que pueden permanecer desconocidas (Treede et al., 2015; Mills et al., 2019). También se manifiesta con síntomas adicionales, como fatiga, cambios de humor, dificultad para dormir y tendencias suicidas (Fine, 2011). Los pacientes que experimentan dolor crónico suelen presentar una disminución significativa en su calidad de vida, que comúnmente se asocia con reducción de la productividad, pérdida de ingresos, empeoramiento de enfermedades crónicas, y trastornos psiquiátricos como depresión, ansiedad, y abuso de sustancias, lo que aumenta la gravedad de esta condición (Mills et al., 2019).

El dolor crónico no se limita únicamente a una sensación prolongada de malestar, sino que también surge como consecuencia de una serie de alteraciones patológicas en el sistema nervioso (Fine, 2011; Raffaelli & Arnaudo, 2017). Estas alteraciones incluyen

la activación y sensibilización de neuronas nociceptivas, la plasticidad sináptica y la sensibilización inflamatoria; que en consecuencia generan una mayor sensibilidad al dolor y dolor persistente, dando paso a la transición del dolor de un fenómeno agudo a un estado crónico (Nieto et al., 2020). El manejo actual del dolor crónico incluye una amplia gama de terapias farmacológicas y no farmacológicas. Entre las farmacológicas, se destacan los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), el paracetamol, la aspirina, así como fármacos más potentes como los opioides y antiepilépticos como la gabapentina o pregabalina (Alorfi, 2023). A pesar de su eficacia en el alivio del dolor, estos medicamentos presentan limitaciones importantes. El riesgo de adicción, la tolerancia y los efectos adversos plantean preocupaciones significativas en su uso prolongado, lo que ha impulsado la búsqueda constante de nuevas estrategias terapéuticas que sean más seguras y efectivas. En este contexto, la modulación de blancos moleculares específicos dentro del sistema nervioso central, como los receptores de glicina, ha emergido como una alternativa prometedora para el manejo del dolor crónico (Varrassi et al., 2010).

1.2 Receptores de glicina

Los receptores de glicina (GlyRs por sus siglas en inglés) pertenecen a la superfamilia de canales iónicos pentaméricos activados por ligandos (pLGICs por sus siglas en inglés). Estos canales median el paso de iones cloruro y modulan la transmisión sináptica rápida entre las interneuronas y las neuronas motoras en los circuitos de reflejo de la médula espinal y el tronco encefálico. Estos receptores pueden estar

compuestos únicamente de subunidades α (receptores homoméricos) o de una combinación de subunidades α y β (receptores heteroméricos) (Lynch, 2004). Los humanos tienen cuatro genes que codifican las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y β del GlyR: GLRA1, GLRA2, GLRA3 y GLRB (Lynch, 2009; Zeilhofer et al., 2018, 2021). Los genomas de otros mamíferos, incluidos los roedores y los primates no humanos, contienen un gen adicional (GLRA4) que codifica la subunidad $\alpha 4$. En los humanos, el gen GLRA4 no puede expresarse de forma funcional debido a varias mutaciones, incluyendo cambios de aminoácidos y un codón de parada prematuro (Zhu & Gouaux, 2021).

Los GlyRs se caracterizan por tener una estructura pentamérica formada por cinco subunidades, con un dominio extracelular amino-terminal (DEC), donde cada subunidad atraviesa la membrana con cuatro dominios transmembrana (DTM1-4) (**Figura 1**) y un amplio dominio intracelular (DIC) (cuya estructura no ha sido resuelta) situado entre los dominios transmembrana TM3 y TM4 (Du et al., 2015; Huang et al., 2015). El DEC contiene el sitio ortostérico, y el DIC es responsable de la modulación intracelular, el cual varía en longitud y composición entre las subunidades y puede influir en la regulación y el tráfico del receptor; mientras que los dominios TM2 delimitan el canal iónico (Lynch, 2004). Esta disposición se asemeja a la de otros receptores de la familia pLGICs, como los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs por sus siglas en inglés), receptor de serotonina tipo 3 (5HT3), así como receptores de ácido γ -aminobutírico tipo A y C (GABA_AR; GABA_CR) (Brejc et al., 2001; Grudzinska et al., 2005; Lynch, 2004). La subunidad β no puede formar canales funcionales por sí sola, pero es necesaria para que los canales se mantengan en la sinapsis. Esto se debe a

que el DIC de la subunidad β interactúa con la gefirina, lo que ayuda a estabilizar los canales y a mantenerlos en su lugar (Groeneweg et al., 2018; Tyagarajan & Fritschy, 2014).

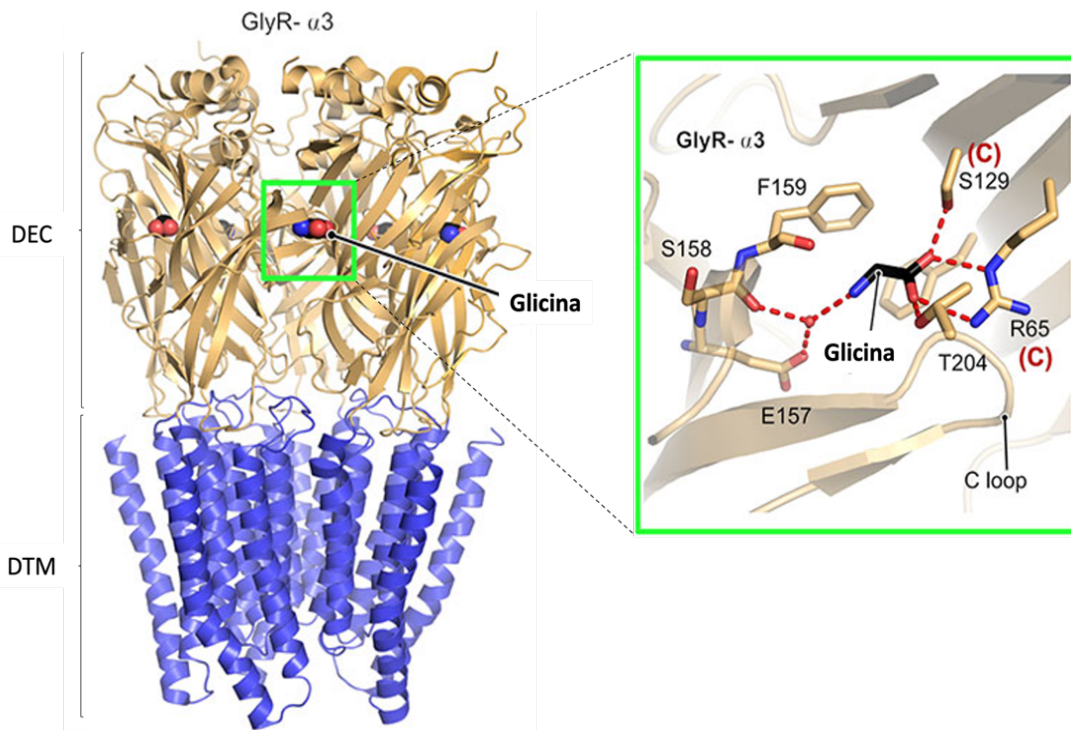


Figura 1. Estructura de GlyR $\alpha 3$ y su interacción con glicina. Se observa el dominio extracelular (DEC) y el dominio transmembrana (DTM), resaltando los residuos clave que participan en la interacción con la glicina, los cuales estabilizan la unión del ligando al receptor, promoviendo su activación. Adaptado de: Kasaragod & Schindelin (2018).

Los GlyRs se expresan a diferentes niveles del sistema nervioso central, incluyendo la médula espinal, el tronco encefálico y la retina. Juegan un papel clave en la transmisión

sináptica inhibitoria, lo cual permite el control de la excitabilidad de la red neuronal. También están involucrados en funciones no sinápticas, como la inhibición tónica y la liberación de neurotransmisores presinápticos (Murakami et al., 1988; Baer et al., 2011). Los GlyRs transitan por diversas conformaciones, que incluyen estados abierto, cerrado y desensibilizado. Estos estados son relevantes para entender su función y cómo los distintos ligandos afectan su comportamiento. En el estado abierto, GlyR permite la entrada de iones cloruro a la célula, lo cual ocurre en respuesta a la activación por su agonista glicina. Contrariamente, en el estado cerrado, el canal se encuentra inaccesible y se bloquea el tránsito de iones cloruro; esto se observa cuando el receptor está inactivo o cuando un antagonista previene su activación. Por último, el estado de desensibilización se da cuando, a pesar de la presencia continua del agonista, el receptor ya no responde y mantiene el canal cerrado, un proceso que resulta en una menor sensibilidad al agonista debido a cambios conformacionales que disminuyen la afinidad del receptor por dicho agonista (Prevost et al., 2013; Gibbs et al., 2023).

1.3 Los receptores de glicina GlyR α 3 y su relevancia en el dolor crónico

Los receptores de glicina, especialmente GlyR α 3, son fundamentales en la modulación del dolor crónico, al influir en la inhibición sináptica rápida y en la transmisión de señales de dolor desde la médula espinal hasta el cerebro (Dutertre et al., 2012). La activación de estos receptores por la glicina provoca una hiperpolarización de las neuronas, reduciendo así la transmisión de señales dolorosas. Los GlyRs, por tanto,

son objetivos cruciales para los tratamientos que buscan restablecer su función inhibitoria y lograr un alivio del dolor (Zeilhofer et al., 2021).

La fosforilación de las subunidades $\alpha 1\beta$ y $\alpha 3\beta$ de los GlyRs se ha identificado como un factor en la desinhibición espinal asociada al dolor inflamatorio crónico, evidenciando el complejo papel de estas subunidades en la percepción y persistencia del dolor (Han et al., 2013; Zeilhofer et al., 2021). Las subunidades $\alpha 2$ y β también están implicadas en la señalización del dolor, aunque su papel es menos comprendido y requiere mayor investigación (Maynard et al., 2021; Zeilhofer et al., 2021). Además de estas funciones relacionadas al dolor, los GlyRs participan en otros procesos fisiológicos como el control motor y la percepción sensorial (Imlach, 2017; Molchanova et al., 2018).

La fosforilación del GlyR $\alpha 3$ ocurre cuando la prostaglandina E2 (PGE2) se une a su receptor EP2 y activa la proteína quinasa A (PKA), que a su vez fosforila la serina en la posición 346 (S346). Este proceso no altera directamente la afinidad del receptor por la glicina, pero sí modula su respuesta, reduciendo las corrientes glicinérgicas (**Figura 2**) (Acuña et al., 2016; Moraga-Cid et al., 2020). Esto puede llevar a una desinhibición de las neuronas nociceptivas en el asta dorsal de la médula espinal, aumentando la excitabilidad neuronal y contribuyendo a la hipersensibilidad al dolor (Harvey et al., 2011; Moraga-Cid et al., 2020; Werynska et al., 2021).

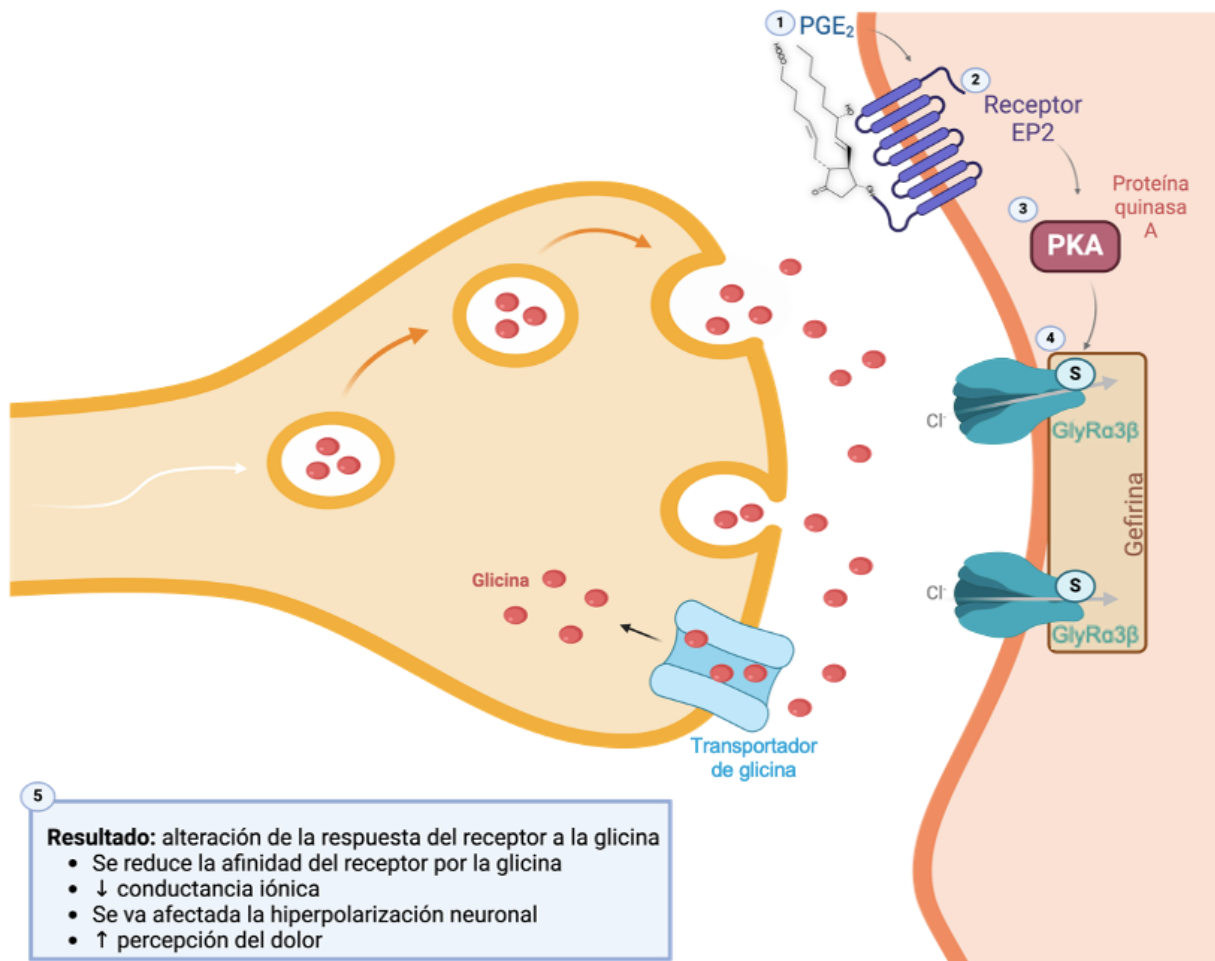


Figura 2. Mecanismo de regulación de la actividad de GlyRα3. Representación del proceso mediado por la prostaglandina E2 (PGE₂). La PGE₂ se une a su receptor EP2 en la membrana celular (1), activando la proteína quinasa A (PKA) (2), que fosforila la serina 346 (S346) en el dominio intracelular (DIC) de GlyRα3 (3). Esta fosforilación reduce la afinidad del receptor por la glicina, disminuye la conductancia iónica y afecta la hiperpolarización neuronal, incrementando la percepción del dolor (4). La proteína gefirina se muestra estabilizando el GlyRα3 en la membrana interactuando con la subunidad beta.

GlyR α 3 no solo se establece como un componente crucial en la patogenia del dolor crónico sino también como una posible vía para el desarrollo de analgésicos más efectivos. La intervención farmacológica que impida la fosforilación de S346 o recupere la función del receptor fosforilado podría restablecer la inhibición y proporcionar alivio en las condiciones de dolor crónico. A pesar de los avances, sigue siendo esencial profundizar en el entendimiento de cómo la fosforilación de las distintas subunidades de los GlyRs contribuye a la señalización del dolor y su estado persistente (Han et al., 2013; Maynard et al., 2021; Zeilhofer et al., 2021).

1.4 Efecto de las mutaciones fosfomiméticas en GlyR α 3

La fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales más relevantes en la regulación de procesos biológicos. Este mecanismo modula múltiples aspectos de los receptores de membrana, como su expresión, internalización, cambios conformacionales y funcionalidad general (Breitinger & Breitinger, 2020). En GlyR α 3, los sitios de fosforilación ubicados en el bucle intracelular entre las regiones TM3 y TM4 desempeñan un papel clave en la regulación de su actividad. PKA ha sido identificada como una de las principales quinasas responsable de las modificaciones postraduccionales. Este proceso es particularmente relevante en las neuronas del asta dorsal, donde la activación del receptor EP2 por PGE2 genera una cascada de señalización que culmina en la fosforilación del GlyR α 3, disminuyendo las corrientes

evocadas por glicina, pero sin afectar otros receptores como los de GABA_A o NMDA (Ahmadi et al., 2002). Como se detalló previamente, en GlyR α 3 la fosforilación del residuo S346 conduce a una reducción de la conductancia del canal sin afectar la afinidad por glicina ni la expresión en la superficie celular. Las mutaciones fosfomiméticas como la sustitución de la serina por ácido glutámico en la posición 346 (S346E), imitan este estado fosforilado, permitiendo estudiar sus efectos sobre la actividad del receptor. Aunque esta modificación ocurre en el dominio intracelular (DIC), su implicancia para el sitio alostérico en el dominio extracelular (DEC) radica en la alteración de la conductancia del receptor (Moraga-Cid et al., 2020).

Estudios en modelos animales han destacado la importancia de la subunidad α 3 de GlyR en la modulación de las respuestas al dolor inflamatorio. En ratones knockout para esta subunidad, se demostró que su ausencia elimina los efectos de sensibilización al dolor inflamatorio mediados por la activación de PKA a través del receptor EP2 (Harvey et al., 2004). Esto destaca el papel fundamental del GlyR α 3 en los procesos de transmisión sináptica inhibitoria bajo condiciones patológicas. En este contexto, se han utilizado las mutaciones fosfomiméticas en GlyR α 3 como un modelo valioso para estudiar el procesamiento del dolor.

Además, se ha demostrado que las corrientes glicinérgicas disminuidas por la fosforilación dependiente de PKA son específicas de los GlyR α 3 sinápticos heteroméricos, subrayando la especificidad molecular de este proceso en la sensibilización al dolor (Zeilhofer et al., 2021; San Martín et al., 2022). Estos avances han impulsado el desarrollo de herramientas farmacológicas, como los moduladores

alostéricos positivos (MAPs), que buscan restaurar la actividad funcional del GlyR α 3 sináptico. Los MAPs han mostrado efectos antinociceptivos prometedores en modelos preclínicos, consolidándose como una estrategia terapéutica potencial para el manejo del dolor inflamatorio crónico. Así, el GlyR α 3 se presenta no solo como un elemento central en la fisiopatología del dolor inflamatorio, sino también como un objetivo clave para el diseño de tratamientos innovadores (Acuña et al., 2016; Zeilhofer et al., 2018).

1.5 Moduladores alostéricos positivos del receptor de glicina

Los moduladores alostéricos positivos (MAPs) de los GlyRs son compuestos que potencian la actividad del receptor al unirse a sitios alostéricos del receptor, es decir, a sitios diferentes a los que se une el agonista endógeno (**Figura 3**) (Gallagher et al., 2022). Diversas investigaciones sugieren que los GlyR α 3 son blancos terapéuticos prometedores para el tratamiento del dolor crónico, debido a su capacidad para mediar la inhibición sináptica y la antinocicepción (Yevenes & Zeilhofer, 2011; Cerdan et al., 2020; Gallagher et al., 2022). Entre los MAPs estudiados las avermectinas, como la ivermectina, han mostrado potenciar las corrientes glicinérgicas, sin embargo, su aplicación clínica es limitada por su baja selectividad y efectos secundarios (Shan et al., 2001). Otros agentes, como los alcoholes y anestésicos generales, tales como el etanol y el propofol, también potencian los receptores de glicina, pero su falta de selectividad y efectos secundarios restringen su uso terapéutico (Lobo & Harris, 2005; Germann et al., 2016). Por otro lado, los cannabinoides, como el canabidiol (CBD) y sus análogos modificados, así como ciertos lípidos, han demostrado ser moduladores de

los receptores de glicina con un potencial terapéutico (Yévenes & Zeilhofer, 2011; Xiong et al., 2012). Además, las tropeinas, que incluyen compuestos como el tropisetron, han demostrado tener efectos antinociceptivos y la capacidad de potenciar los GlyRs, ofreciendo un camino prometedor para el desarrollo de MAPs con perfiles farmacocinéticos favorables para el tratamiento del dolor crónico (San Martín et al., 2019).

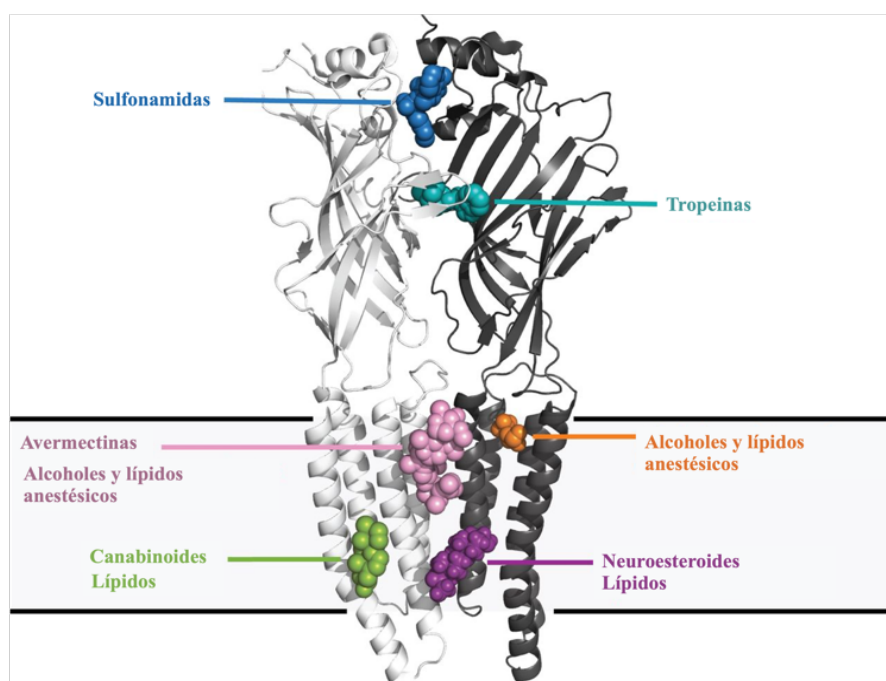


Figura 3. Sitios de unión de los MAPs reportados para GlyR. Representación de los diferentes sitios de unión de MAPs en GlyR. Entre los MAPs destacados se incluyen las sulfonamidas, tropeinas, avermectinas, cannabinoides, lípidos, neuroesteroides y alcoholes y lípidos anestésicos, cada uno identificado en

ubicaciones específicas del receptor. Estos sitios reflejan la diversidad de interacciones químicas que modulan la actividad del GlyR. Adaptado de: Gallagher et al. (2022).

1.6 Sulfonamidas

Las sulfonamidas constituyen una clase específica de MAPs con gran potencial terapéutico para el manejo del dolor crónico. Aunque son ampliamente conocidas por sus propiedades antibióticas bacteriostáticas, su versatilidad química ha permitido expandir su aplicación hacia diversas condiciones patológicas como alergias, epilepsia, hipertensión y glaucoma (Gallagher et al., 2022). En el contexto de los GlyRs, las sulfonamidas desarrolladas por Pfizer y Amgen destacan debido a su capacidad para modular selectivamente estos receptores, sin afectar significativamente a otros receptores, como por ejemplo los GABA_A, diferenciándose así de otros MAPs (Bregman et al., 2017; Gallagher et al., 2022). Esta selectividad y especificidad estructural resaltan la importancia del diseño racional de nuevos MAPs dirigidos a los GlyRs para el tratamiento del dolor crónico (Mujumdar & Poulsen, 2015).

Las sulfonamidas, caracterizadas por la presencia de un grupo funcional SO₂NH₂, han demostrado tener capacidad para potenciar las subunidades GlyR α 1 y GlyR α 3 sin inducir déficits motores, ni efectos adversos significativos. Destacan particularmente las benceno-sulfonamidas y las sulfonamidas tricíclicas con anillos de benzodioxol,

que presentan interacciones químicas optimizadas con sitios específicos del GlyR α 3 mediante enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, fundamentales para su selectividad y potencia farmacológica (Bregman et al., 2017).

Los avances en biología estructural han proporcionado una comprensión más detallada sobre la funcionalidad molecular de los GlyRs, especialmente de GlyR α 3 (Bregman et al., 2017; Gallagher et al., 2022). En este ámbito, destaca la sulfonamida AM-3607 desarrollada por Amgen (**Figura 4**), que presenta perfiles farmacocinéticos y de potencia favorables. Sin embargo, su falta de selectividad entre las subunidades α 3 y α 1 del receptor limita su potencial terapéutico (Bregman et al., 2017; Huang et al., 2016). Este compuesto ha adquirido gran relevancia al haber sido co-cristalizado con GlyR α 3, proporcionando la primera estructura cristalográfica de rayos X de un potenciador unido a un nuevo sitio alostérico en este canal iónico. Esta estructura permitió identificar interacciones moleculares esenciales en el sitio alostérico, como enlaces de hidrógeno entre el oxígeno del grupo sulfonilo de AM-3607 y el residuo R29, así como interacciones hidrofóbicas con diversos residuos aminoacídicos (Huang et al., 2016).

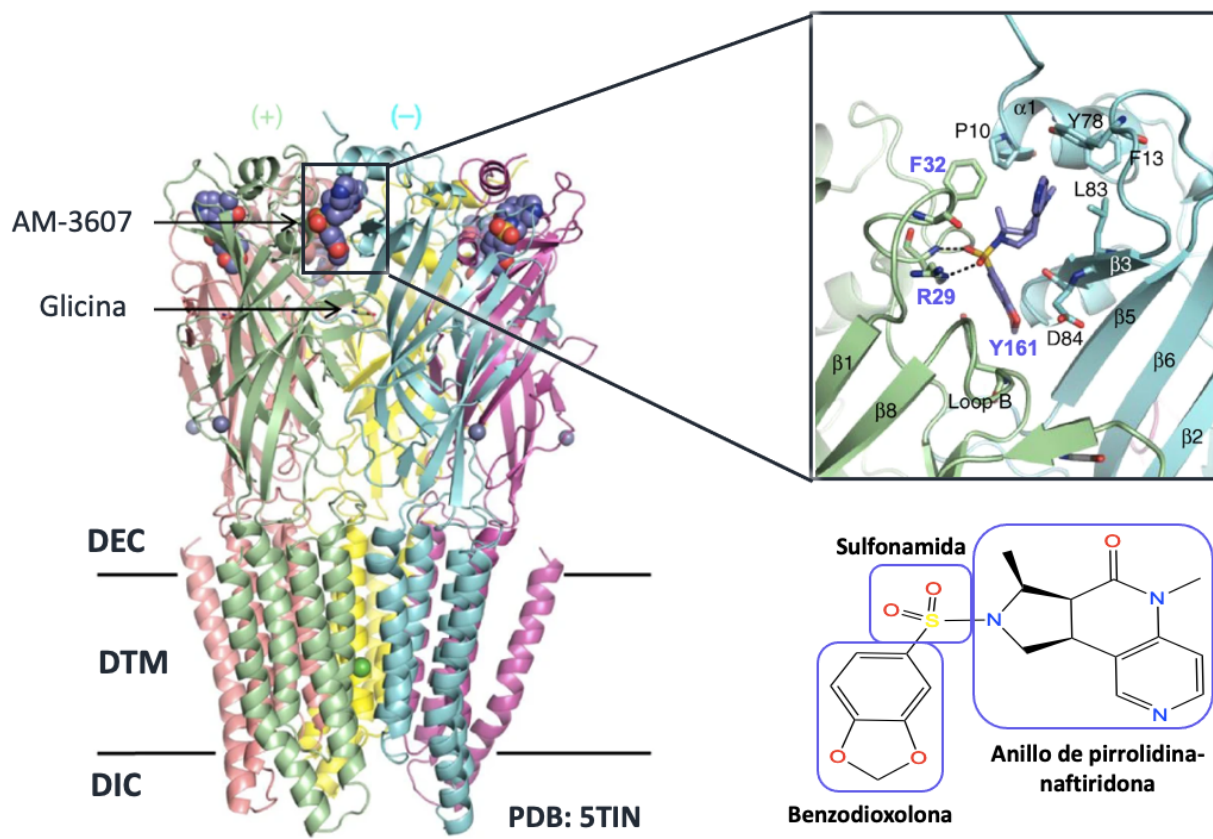


Figura 4. Estructura cristalográfica de GlyRα3 en complejo con glicina y AM-3607. Representación de GlyRα3 en complejo con su agonista endógeno glicina y el MAP AM-3607. Se destacan el dominio extracelular (DEC), el dominio transmembrana (DTM) e intracelular (DIC), así como el sitio de unión de AM-3607 en el dominio extracelular intersubunidad, identificado mediante interacciones clave con residuos específicos. Estas interacciones incluyen enlaces con residuos como R29, Y161, y F32, que son esenciales para la estabilización del modulador en el receptor. Además, se presenta la estructura química del compuesto AM-3607. Adaptado del modelo PDB: 5TIN de Huang et al. (2015).

En este contexto, los heterociclos con átomos de nitrógeno, especialmente las tetrahydroquinolinas (THQs), han emergido como estructuras versátiles y de gran importancia en química medicinal y biología, así como en la industria farmacéutica y agroquímica. Las THQs son heterociclos biológicamente activos presentes en numerosos metabolitos naturales, con actividad farmacológica contra el VIH, además de propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, anticancerígenas y antiinflamatorias, lo cual destaca su amplio potencial terapéutico (Muthukrishnan et al., 2019). Su rigidez estructural y capacidad para participar eficientemente en interacciones pi-pi y enlaces de hidrógeno, las convierte en estructuras ideales para mejorar la afinidad y selectividad hacia objetivos específicos (Kumar et al., 2021). Específicamente, la incorporación de anillos de THQ en derivados de sulfonamidas podría optimizar la interacción con el sitio alostérico del GlyR α 3 fosforilado, buscando potenciar su actividad inhibitoria y, de esta forma, contrarrestar la sensibilización central asociada al dolor crónico.

Considerando que AM-3607 es un MAP potente del GlyR3 humano, constituye una molécula de referencia ideal para el diseño y síntesis de nuevos compuestos derivados. En este contexto, el presente proyecto se enfoca en desarrollar derivados de sulfonamidas que incorporen estratégicamente anillos de THQ y anillos aromáticos sustituidos, con el objetivo de revertir la inhibición de la actividad mediada por fosforilación y restaurar la actividad funcional de GlyR α 3 fosforilado, ofreciendo así una innovadora potencial alternativa terapéutica para el tratamiento del dolor crónico.

2 HIPÓTESIS

La fosforilación del receptor de glicina $\alpha 3$ (GlyR $\alpha 3$) en el residuo de serina 346, catalizada por la proteína quinasa A (PKA), ha sido identificada como un mecanismo clave en la supresión de las corrientes glicinérgicas, lo que contribuye a la sensibilización y percepción del dolor (Acuña et al., 2016). Este fenómeno biológico ha sido estrechamente relacionado con el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico, una condición que afecta de manera significativa la calidad de vida de las personas que lo padecen (Moraga-Cid et al., 2020).

En este contexto, los moduladores alostéricos positivos (MAPs) surgen como una nueva clase de compuestos con potencial terapéutico. En particular, las sulfonamidas que incorporan anillos de tetrahydroquinolina (THQ) en su estructura emergen como candidatos prometedores, capaces de revertir la inhibición provocada por la fosforilación. Estos compuestos podrían restablecer la actividad funcional de GlyR $\alpha 3$, permitiendo nuevamente la transmisión de corrientes glicinérgicas y ofreciendo un enfoque novedoso para el alivio del dolor (Zeilhofer et al., 2021).

A partir de lo anterior se postula la siguiente hipótesis:

“Los derivados de sulfonamidas con anillos de tetrahydroquinolina (THQ) son capaces de revertir la inhibición de la función del GlyR $\alpha 3$, inducida por eventos de fosforilación mediada por PKA.”

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Diseñar nuevas sulfonamidas como moduladores alostéricos positivos del receptor de glicina $\alpha 3$ que porta una mutación fosfomimética (S346E).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 OE1: Diseñar computacionalmente derivados de sulfonamidas basados en núcleos de tetrahydroquinolinas.

3.2.2 OE2: Caracterizar el modo de unión de los derivados de sulfonamidas con anillos de tetrahydroquinolinas mediante simulaciones de dinámica molecular.

3.2.3 OE3: Evaluar la actividad biológica de las sulfonamidas diseñadas mediante registros electrofisiológicos del receptor de glicina $\alpha 3$ que porta una mutación fosfomimética.

4 METODOLOGÍA

4.1 OE1: Diseñar computacionalmente derivados de sulfonamidas basados en núcleos de tetrahydroquinolinas

4.1.1 Análisis comparativo del sitio de unión de AM-3607 entre GlyR α 1 y GlyR α 3

4.1.1.1 Comparación de secuencias entre GlyR α 1 y GlyR α 3

Para evaluar las diferencias estructurales entre GlyR α 1 y GlyR α 3 (humanos), se realizó un alineamiento de secuencias. Las secuencias de ambos receptores fueron obtenidas a partir de sus identificadores en UniProt (GlyR α 1: P23415 y GlyR α 3: O75311) y comparadas utilizando Clustal Omega (Sievers et al., 2020), lo que permitió calcular su porcentaje de identidad y analizar la conservación de residuos clave mediante Jalview (Waterhouse et al., 2009). Este análisis permitió identificar similitudes y divergencias en las regiones funcionales de ambos receptores, proporcionando información que justificó el diseño de moduladores específicos para GlyR α 3.

4.1.1.2 Identificación del sitio de unión de AM-3607

Se descargaron las estructuras cristalográficas de GlyR α 1 (PDB: 8DN3) y GlyR α 3 (PDB: 5TIO) de la base de datos Protein Data Bank (PDB). En ambas proteínas, se

eliminaron iones, azúcares de cristalización y cualquier otra molécula accesoria no relacionada con la interacción ligando-receptor. Se identificaron los residuos que forman parte del sitio de unión de AM-3607 en GlyR α 3. Se prepararon y optimizaron computacionalmente las estructuras de GlyR α 1 y GlyR α 3 con aM-3607 a un pH de 7.4 $\pm$ 0.2 mediante el software Maestro (Schrödinger, LLC, NY) y posteriormente se eliminó el ligando de la estructura para comparar únicamente los residuos del sitio de unión.

4.1.1.3 Alineamiento estructural y cálculo de RMSD del sitio de unión de AM-3607

Para analizar las diferencias conformacionales del sitio de unión de AM-3607 en GlyR α 1 y GlyR α 3, se realizó un alineamiento estructural de los dominios extracelulares de ambos receptores. Se calculó el área del sitio de unión y los valores de RMSD (*Root Mean Squared Deviation*) tanto para la cavidad completa como para cada uno de los residuos individuales. El alineamiento se realizó mediante superimposición estructural utilizando como referencia el sitio de unión de AM-3607 en GlyR α 3. De esta forma se identificaron diferencias estructurales entre los sitios de unión de GlyR α 1 y GlyR α 3, las cuales permitieron justificar el diseño computacional de nuevas sulfonamidas dirigidas a GlyR α 3.

4.1.2 Diseño computacional de derivados de sulfonamidas con anillos de THQ

4.1.2.1 Diseño *in silico* de núcleos de sulfonamidas con anillos de THQ

Mediante el software Maestro de Schrödinger, se diseñaron siete núcleos de sulfonamidas con anillos de THQ, basándose en la arquitectura molecular del ligando de referencia AM-3607, desarrollado por Amgen y depositado en la base de datos PDB (código: 5VDH) (Bregman et al., 2017). El diseño se realizó considerando criterios como la experiencia, viabilidad sintética y accesibilidad química con la que cuenta el Laboratorio de Diseño y Síntesis de Compuestos Bioactivos, dirigido por el Dr. Jhon López, en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción.

4.1.2.2 Desarrollo de quimioteca de sulfonamidas con anillos de THQ mediante sustitución selectiva

Una vez obtenidos los núcleos, se desarrolló una quimioteca de sulfonamidas con anillos de THQ mediante una estrategia de sustitución selectiva, en la que se incorporó una única sustitución por grupo funcional (**Figura 10**). Se definieron dos conjuntos de modificaciones estructurales: para el grupo 1, se realizaron sustituciones en las posiciones R₁ y R₂, se introdujeron hidrógeno (H), metilo (CH₃), nitro (NO₂) y flúor (F), mientras que para el grupo 2, se realizaron sustituciones en las posiciones R₃, R₄, R₅ que incluyeron hidrógeno (H), metilo (CH₃), metoxi (OCH₃), trifluorometilo (CF₃) y

trifluorometoxi (OCF₃) (**Figura 10**). Estas sustituciones fueron seleccionadas con el objetivo de explorar cómo las diferencias en la polaridad y propiedades electrónicas de los grupos funcionales, en particular su capacidad para actuar como donadores o aceptores de densidad electrónica, podrían favorecer distintos tipos de interacciones con residuos clave del sitio de unión.

Tras la generación de la quimioteca, se realizó un proceso de filtrado y limpieza para evitar duplicados. Se estableció que en el grupo R₁R₂ no se repitieran sustituciones a menos que ambas fueran hidrógeno, y que en el grupo R₃R₄R₅, solo se permitiera la presencia de un sustituyente activo, dejando las otras dos posiciones ocupadas por hidrógeno. También se contempló la posibilidad de que las tres posiciones estuvieran ocupadas por hidrógeno, asegurando así una quimioteca de sulfonamidas funcionalizadas, con viabilidad sintética a partir de reactivos disponibles en el laboratorio de Diseño y Síntesis de Compuestos Bioactivos.

4.1.2.3 Preparación del receptor y ligando de referencia

Después de la generación de la quimioteca, se preparó la estructura del cristal del receptor GlyR α 3 (PDB: 5VDH) y el ligando de referencia AM-3607 utilizando el módulo *Protein Preparation Wizard* de la Suite de Maestro (Schrödinger, LLC, NY). Se añadieron hidrógenos, se eliminaron moléculas de agua a más de 5 Å del sitio de unión, y se ajustó el pH a 7.4 $\pm$ 0.5. Para estabilizar el receptor, se ajustaron órdenes de enlace y cargas parciales, además de asignar estados de protonación. También se

renombraron los ligandos co-cristalizados y se les asignaron cadenas diferenciadas dentro de la simulación. Las sulfonamidas diseñadas fueron preparadas en LigPrep de la Suite de Maestro (Schrödinger, LLC, NY) utilizando el campo de fuerza OPLS4, estableciendo un pH de 7.4 ± 0.2 .

4.1.2.4 Alineación estructural de las sulfonamidas con el ligando de referencia

Las sulfonamidas de la quimioteca fueron alineadas con el ligando co-cristalizado AM-3607 (PDB: 5VDH) utilizando el módulo *Align Ligands* de la Suite de Maestro (Schrödinger, LLC, NY). empleando un modo de muestreo exhaustivo con hasta 1000 alineaciones y un umbral de contacto cercano de 0.5 para prevenir interacciones estéricas no deseadas. Para mejorar el alineamiento, se realizó un docking molecular en *Glide* de Maestro (Schrödinger, LLC, NY), con restricciones específicas que aseguraron la formación de enlaces de hidrógeno entre las sulfonamidas y el residuo R29, tal como se observa en el complejo cristalizado de GlyR α 3 con AM-3607 (**Figura 4**). Se aplicaron ajustes como el escalado de los radios de van der Waals para los átomos del ligando y un filtro de energía de Coulomb para descartar interacciones electrostáticas no realistas. Estos procedimientos permitieron garantizar que las moléculas candidatas estuvieran optimizadas para la interacción con el sitio alostérico de GlyR α 3 y que pudieran ser evaluadas de manera eficiente para determinar su potencial como MAPs.

4.1.2.5 Determinación de la energía libre de unión (ΔG_{Bind})

Para evaluar la estabilidad de la interacción entre los compuestos diseñados y GlyR α 3, se realizó el cálculo de la energía libre de unión (ΔG_{Bind}) mediante el método MM-GBSA (*Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*), en *Prime*, software de la Suite de Maestro (Schrödinger, LLC, NY). Inicialmente, se calculó el ΔG_{Bind} del ligando de referencia AM-3607 en complejo con GlyR α 3 sin conferir flexibilidad al ligando, ni a los residuos del sitio de unión (Greenidge et al., 2013). Luego, se calculó el ΔG_{Bind} de las sulfonamidas diseñadas que fueron alineadas con el ligando de referencia (AM-3607) en complejo con GlyR α 3, confiriendo flexibilidad tanto en las sulfonamidas de la quimioteca como en los residuos a menos 5 Å. Finalmente, usando el ΔG_{Bind} de AM-3607 como referencia, se calculó el $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ para cada sulfonamida diseñada utilizando la ecuación:

$$\Delta\Delta G_{\text{Bind}} = \Delta G_{\text{Bind-AM3607}} - \Delta G_{\text{Bind-sulfonamida}}$$

Este análisis permitió identificar las sulfonamidas con las interacciones más estables con GlyR α 3, seleccionando aquellas con valores negativos de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ como los compuestos más prometedores.

4.1.2.6 Selección de mejores derivados para síntesis

De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron los derivados de sulfonamidas más prometedores, estos compuestos se sintetizaron en el Laboratorio de Diseño y Síntesis de Compuestos Bioactivos del Dr. Jhon López, como parte de la colaboración establecida con el Dr. David Ramírez y el Dr. Gustavo Moraga de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Facultad de Ciencias Químicas. No obstante, la síntesis de estos compuestos no forma parte del presente trabajo, por lo que no se incluyen actividades experimentales relacionadas.

4.2 OE2: Caracterizar el modo de unión de los derivados de sulfonamidas con anillos de tetrahydroquinolina mediante simulaciones de dinámica molecular

4.2.1 Preparación de sistemas para simulaciones de Dinámica Molecular (DM)

Para evaluar la estabilidad y el modo de unión de los derivados de sulfonamidas con anillos de THQ sintetizados, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular utilizando el receptor GlyR α 3 (PDB: 5TIO). Se preparó el sistema de GlyR α 3 en complejo con el ligando co-cristalizado AM-3607, manteniendo la disposición original del ligando en el sitio de unión alostérico. Asimismo, se prepararon simulaciones para las sulfonamidas sintetizadas,

posicionándolas en el sitio de unión alostérico de AM-3607 en GlyR α 3, mediante un alineamiento estructural guiado. Para ello, se utilizó como referencia la estructura del cristal de GlyR que tenía cada sulfonamida diseñada (mismo complejo utilizado para el docking molecular y MM-GBSA). Inicialmente, se seleccionó la cadena A del receptor y la sulfonamida, las cuales se copiaron y pegaron en una nueva entrada. Luego se dividieron las subunidades del receptor por cadenas en entradas individuales. Cada cadena del receptor fue superpuesta con la cadena A que tenía la sulfonamida diseñada utilizando el método *Substructures* de Maestro (Schrödinger, LLC, NY), alineando el *backbone* de la proteína. Tras la superposición, la sulfonamida fue copiada nuevamente y pegada para cada una de las cadenas separadas, asegurando que conservara la orientación adecuada en el sitio de unión alostérico. Este procedimiento se realizó para las cinco subunidades del receptor. Finalmente se integraron todas las cadenas con sus respectivas sulfonamidas en un único sistema. Antes de iniciar las simulaciones, se aplicó una minimización energética local para corregir posibles tensiones estéricas derivadas del posicionamiento.

Los complejos obtenidos de aproximadamente 324,000 átomos fueron preparados mediante el *módulo Protein Preparation Wizard* de Maestro (Schrödinger, LLC, NY), eliminando elementos no esenciales que hacen parte de los cristales como iones de zinc, azúcares de cristalización N-acetilglucosamina (NAG) y aguas cristalográficas. Se asignaron órdenes de enlace, se añadieron hidrógenos y se ajustaron los estados de protonación a un pH de 7.4 ± 0.2 . Posteriormente, se optimizaron los enlaces de hidrógeno y se realizó una minimización con el campo de fuerza OPLS4.

Para representar adecuadamente el entorno biológico, los complejos se integraron en un sistema con una membrana POPC (palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina), alineada según la referencia estructural obtenida de OPM (*Orientations of Proteins in Membranes*) (Lomize et al., 2012). Se empleó un modelo de solvatación de aguas de tipo SPC (*Single Point Charge*) en una caja ortorrómbica con condiciones de contorno periódicas. Para neutralizar el sistema, se añadieron contraiones de Na^+ o Cl^- , estableciendo una concentración de 0.15 M de NaCl para simular condiciones fisiológicas en Maestro (Schrödinger, LLC, NY).

4.2.2 Simulaciones de dinámica molecular de equilibrio

Los complejos fueron sometidos a 20 ns de simulaciones de dinámica molecular de equilibrio, utilizando el software Desmond (Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, NY) con el campo de fuerza OPLS4. Se aplicó el protocolo de relajación predeterminado de Desmond, seguido de una simulación bajo el ensamble NPT, manteniendo constantes la presión (1 atm) y la temperatura (300 K). Para preservar la conformación estructural del receptor, se estableció una restricción energética de $10 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1} \times \text{\AA}^{-2}$ sobre los ligandos (AM-3607 y las sulfonamidas sintetizadas) y al esqueleto proteico (*backbone*) del receptor.

4.2.3 Simulaciones de dinámica molecular de producción

El último *frame* de la dinámica molecular de equilibrio se utilizó para realizar las simulaciones de dinámica molecular de producción, estableciendo un tiempo de simulación 500 ns y manteniendo las mismas condiciones descritas anteriormente, pero sin aplicar restricciones energéticas. Se realizaron simulaciones de producción para GlyR α 3 en complejo con AM-3607 y para los derivados de sulfonamidas con anillos de THQ sintetizados, permitiendo evaluar su estabilidad conformacional y su modo de unión en el sitio alostérico del receptor.

4.2.4 Análisis de simulaciones de dinámica molecular

Las trayectorias de simulación de las dinámicas fueron analizadas con Maestro (Schrödinger, LLC, NY) para evaluar la estabilidad y persistencia de la interacción de los ligandos con el receptor. Se emplearon métricas como el RMSD (*Root Mean Squared Deviation*) y perfiles de frecuencia de interacción ligando-receptor para caracterizar la conformación de los complejos a lo largo del tiempo. Además, se identificaron y cuantificaron interacciones clave, incluyendo enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno aromáticos e interacciones de tipo pi-pi, con el objetivo de comprender el modo de unión del ligando de referencia y de los derivados de sulfonamidas sintetizados.

Se compararon las interacciones que establecen las sulfonamidas sintetizadas con GlyR α 3 frente a las interacciones observadas en el complejo cristalográfico del receptor con su ligando de referencia AM-3607. Se evaluó cómo la estructura de las sulfonamidas con anillos de THQ influye en la estabilidad del sitio de unión alostérico, identificando interacciones clave que podrían favorecer su actividad como MAPs. Finalmente, mediante el uso de Pymol se generaron representaciones visuales de las interacciones más estables y relevantes a lo largo de las simulaciones, proporcionando una visión detallada del modo de unión tanto del ligando de referencia como de las sulfonamidas sintetizadas en GlyR α 3.

4.3 OE3: Determinar la actividad biológica de las sulfonamidas diseñadas mediante registros electrofisiológicos del receptor de glicina α 3 fosforilado.

4.3.1 Cultivo, transfección y expresión de GlyR α 3 WT y S346E

Las células HEK293 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés) y mantenidas en incubación a 37°C con 5% de CO₂. La expresión de GlyR α 3 WT y su mutante fosfomimética S346E se llevó a cabo mediante una transfección transitoria con Lipofectamine 2000, utilizando 1 μ g de plásmido codificante para GlyR α 3 WT y 0.5 μ g de plásmido codificante para GFP como marcador de transfección positiva. Para evaluar el impacto de la

fosforilación en la actividad del receptor, se repitió el procedimiento sustituyendo GlyR α 3 WT por la mutante fosfomimética S346E (**Figura 5**). Los plásmidos fueron mezclados en Opti-MEM® (Invitrogen) y aplicados directamente sobre las células. Las células transfectadas fueron incubadas y analizadas entre 16 y 24 horas post-transfección.

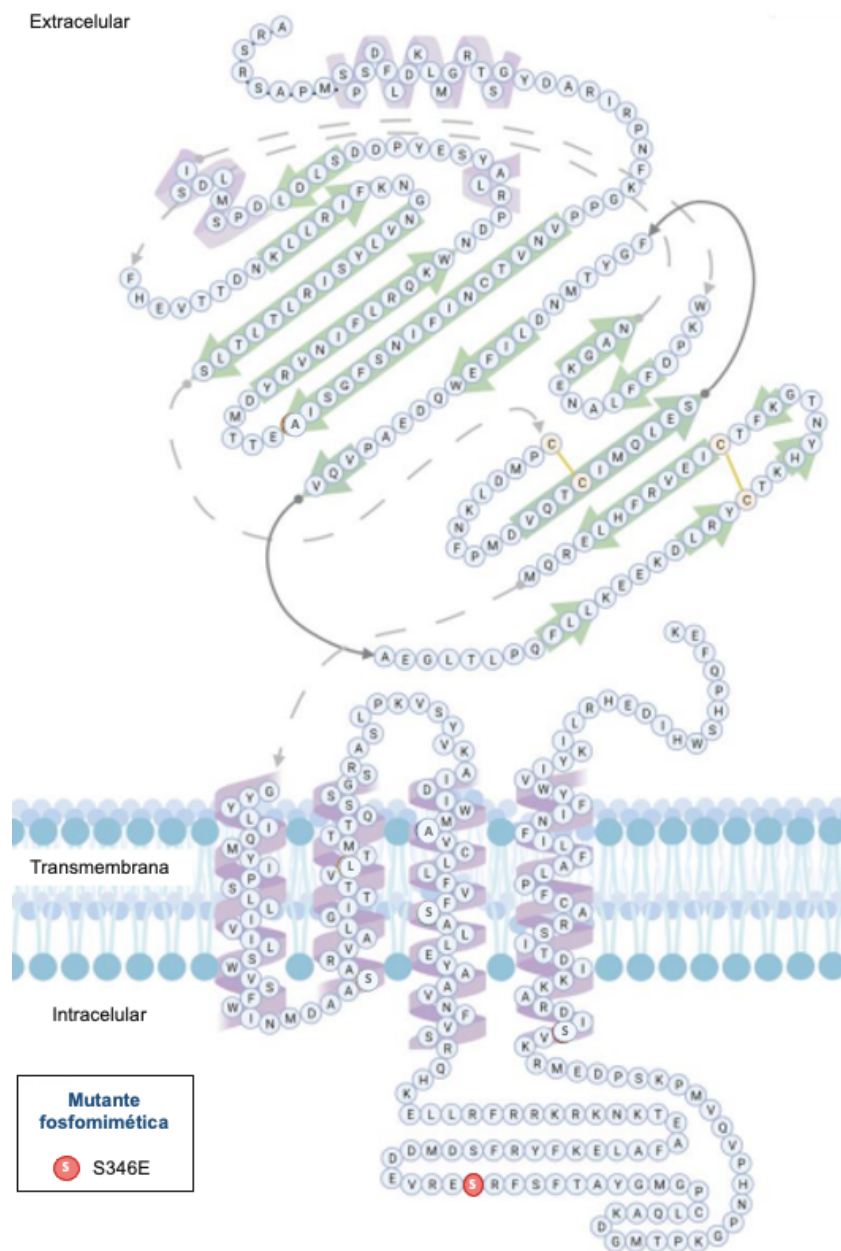


Figura 5. Representación esquemática de la subunidad alfa de GlyR α 3 mostrando la ubicación específica de la mutación fosfomimética S346E. Se resalta en rojo la posición de la serina 346 (S346), localizada en el dominio intracelular, sitio donde se realizó la sustitución por glutamato (mutante S346E) para imitar el efecto

de la fosforilación y estudiar sus implicaciones funcionales. Se indican claramente los dominios extracelular, transmembrana e intracelular del receptor. Adaptado de: Quintana (2023).

4.3.2 Preparación de soluciones y electrodos para registros electrofisiológicos

Para los registros electrofisiológicos, se prepararon soluciones con condiciones iónicas controladas. La solución extracelular contenía 150 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucosa y 10 mM HEPES, ajustada a pH 7.4 y una osmolaridad de 320-330 mOsm. La solución intracelular consistió en 120 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP-Na₂, 10 mM BAPTA, 0.5 mM GTP y 10 mM HEPES, con un pH de 7.35-7.4 y una osmolaridad de 290-310 mOsm. Ambas soluciones fueron almacenadas a -4°C y -20°C respectivamente, hasta su uso. Además, se preparó una solución stock de glicina (10 mM), que se diluyó a concentraciones de 3 a 1000 µM.

Las pipetas de registro fueron fabricadas a partir de capilares de borosilicato, empleando un puller vertical (Narishige PC-100) y refinadas con una microforja (MF-830, Narishige, Japón), obteniendo resistencias de 3-6 MΩ adecuadas para registros en configuración de célula completa (*whole-cell*). DE 16 a 24 horas post-transfección, las células transfectadas se identificaron por la fluorescencia de GFP mediante un

microscopio invertido (Diaphot, Nikon, Japón) acoplado a una unidad de fluorescencia. Las células GFP-positivas fueron seleccionadas para realizar los registros electrofisiológicos, manteniendo un potencial de membrana de -60 mV.

4.3.3 Evaluación de corrientes y moléculas prometedoras

Para determinar la actividad de GlyR α 3 WT y S346E, se realizaron curvas concentración-respuesta a partir de registros electrofisiológicos y se determinó el valor de EC₅₀ en cada caso. Se aplicó glicina manualmente mediante un sistema de microperfusión por gravedad a una distancia de 50-100 μ m de la célula registrada, utilizando concentraciones crecientes de 3 a 100 μ M. Las curvas se construyeron a partir de las amplitudes de las corrientes evocadas por glicina utilizando la ecuación:

$$I_{Gly} = I_{max} (Gly)^{nH} / ((Gly)^{nH} + (EC_{50})^{nH})$$

Donde I_{max}, corresponde a la corriente máxima obtenida en presencia del agonista glicina y nH corresponde al número de Hill, valor que da cuenta del número de sitios

promedio al cual el agonista puede acceder. Además, los parámetros EC_{50} y los coeficientes de Hill, (nH) fueron obtenidos de la ecuación descrita anteriormente.

Posteriormente, se evaluó el efecto de las sulfonamidas con anillos de THQ sintetizadas, aplicando concentraciones de 1, 10 y 50 μM en ambos estados del receptor. Para estos ensayos, las moléculas fueron disueltas inicialmente en DMSO al 100% y luego diluidas en concentraciones de 1, 10 y 50 μM en solución de glicina a 50 μM (concentración sub-saturante cercana al EC_{20}).

Las sulfonamidas con anillos de THQ que demostraron modular la respuesta de GlyR α 3 WT y S346E fueron sometidas a análisis adicionales para determinar su potencial como MAPs, estableciendo curvas de concentración-respuesta, con aplicaciones crecientes de 3 a 1000 μM de cada molécula en solución de glicina a 50 μM (EC_{20}), utilizando un sistema de perfusión continua. Las corrientes inducidas fueron registradas en configuración voltage-clamp a -60 mV, con un amplificador EPC10 (HEKA Electronics, Alemania) y almacenadas mediante el software PatchMaster (HEKA Electronics, Alemania). Todos los registros fueron analizados y cuantificados con ClampFit 9.0 (Axon Instruments), mientras que la conversión de datos se realizó utilizando Origin 6.0 (Microcal, EE.UU.) y Prism 10 (GraphPad Software).

5 RESULTADOS

5.1 OE1: Diseñar computacionalmente derivados de sulfonamidas basados en núcleos de tetrahydroquinolinas

5.1.1 Análisis comparativo del sitio de unión de AM-3607 entre GlyR α 1 y GlyR α 3

La comparación entre GlyR α 1 y GlyR α 3 fue esencial para evaluar si existen diferencias estructurales en el sitio de unión alostérico que puedan influir en la selectividad de los ligandos diseñados. La selectividad es un factor crítico, ya que la interacción con GlyR α 1 podría comprometer la especificidad terapéutica y generar efectos no deseados. Si bien ambos receptores presentan una alta similitud estructural en el bolsillo de unión a sulfonamidas, diferencias en la geometría del sitio podrían impactar la afinidad y estabilización de los ligandos. Estas distinciones son clave para comprender su modulación diferencial y explorar estrategias dirigidas a revertir la inhibición funcional del GlyR α 3 inducida por fosforilación.

Para analizar estas diferencias, se realizó un alineamiento de secuencias y un análisis estructural detallado del sitio de unión. Se utilizó a AM-3607 como referencia estructural, dado que su cristalización permitió caracterizar con precisión la

organización del sitio de unión en GlyR α 3 y compararla con GlyR α 1 (Bregman et al., 2017). Esto permitió evaluar si existen diferencias que puedan favorecer el diseño de ligandos con mayor especificidad por GlyR α 3 sin afectar GlyR α 1, con el fin de identificar potenciales candidatos para restaurar la función del receptor fosforilado.

5.1.1.1 Alineamiento de secuencias y conservación de residuos

El alineamiento de secuencias entre GlyR α 1 y GlyR α 3, realizado con Clustal Omega, mostró un alto porcentaje de identidad de secuencia (82%), destacando una alta conservación de regiones funcionales clave (**Figura 6**). En particular, los residuos que conforman el sitio de unión alostérico de AM-3607, resaltados en color naranja, están altamente conservados en ambas subunidades. Esto sugiere que las diferencias en la interacción del ligando podrían estar más relacionadas con variaciones conformacionales y dinámicas propias de cada subunidad, en lugar de cambios en la composición aminoacídica.

Por otro lado, los residuos con menor grado de conservación se encuentran principalmente en la región extracelular *N*-terminal y en el dominio intracelular. Estas diferencias podrían influir en procesos como la regulación postraducciona, la estabilidad estructural y el tráfico celular, sin afectar directamente la interacción con el ligando. Esto resalta la importancia de considerar las propiedades dinámicas y

estructurales específicas de cada receptor en el diseño de MAPs selectivos para GlyRa3.

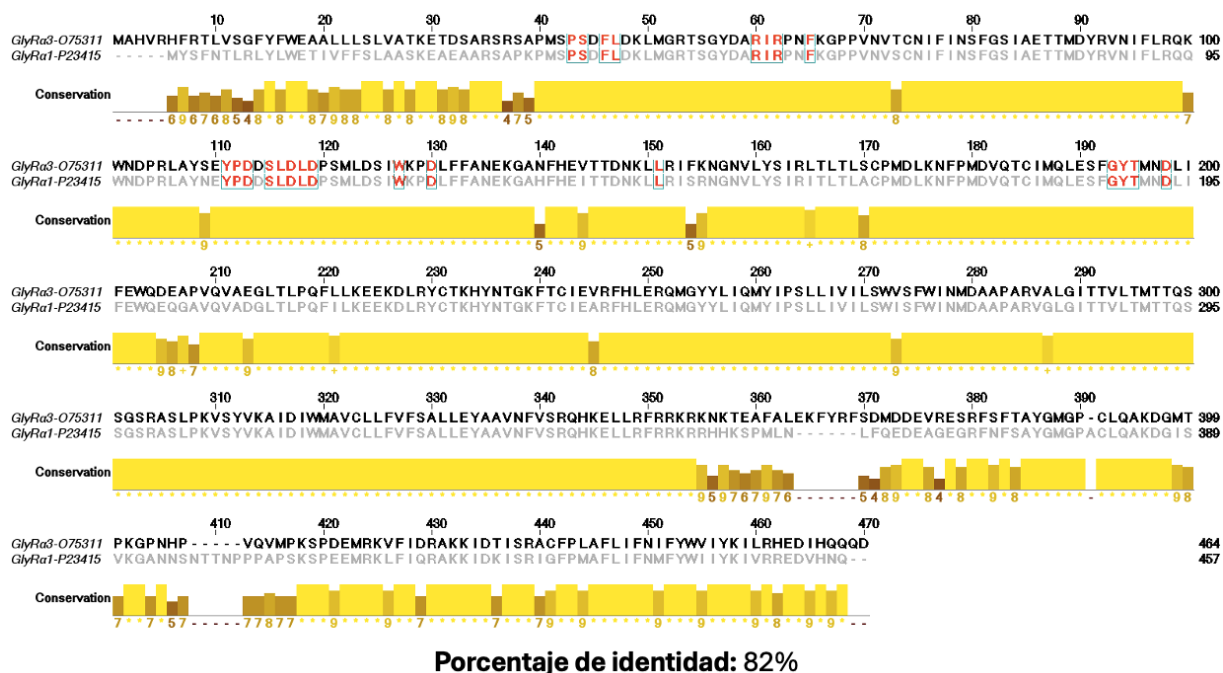


Figura 6. Alineamiento de secuencias de GlyRa1 y GlyRa3 humano. El grado de conservación de los residuos se representa en variantes de color amarillo, mientras que los residuos específicos del sitio de unión alostérico de AM-3607 están resaltados en naranja. El alineamiento mostró diferencias concentradas principalmente en regiones fuera del sitio de unión.

5.1.1.2 Identificación y caracterización del sitio de unión alostérico de GlyR α 3

El análisis estructural del cristal de GlyR α 3 (PDB: 5TIO), permitió identificar el sitio de unión alostérico de AM-3607, ubicado en el dominio extracelular del receptor, en la interfaz entre dos subunidades α del receptor, específicamente entre las cadenas A (naranja) y B (verde) (**Figura 7**). El sitio de unión está delimitado por los residuos que se encuentran dentro de un radio de 6 Å alrededor del ligando, definiendo así la cavidad en la que se acomoda AM-3607. Entre los residuos clave identificados, R29 establece un puente de hidrógeno con el grupo sulfonamida de AM-3607, una interacción esencial que asegura la unión del ligando. Además, F32 participa mediante interacciones pi-pi, que refuerzan aún más la estabilidad del ligando en el sitio de unión (**Figura 7**). La organización espacial definida por estos residuos y sus interacciones específicas permiten caracterizar con precisión el sitio alostérico responsable de la interacción con AM-3607 en GlyR α 3.

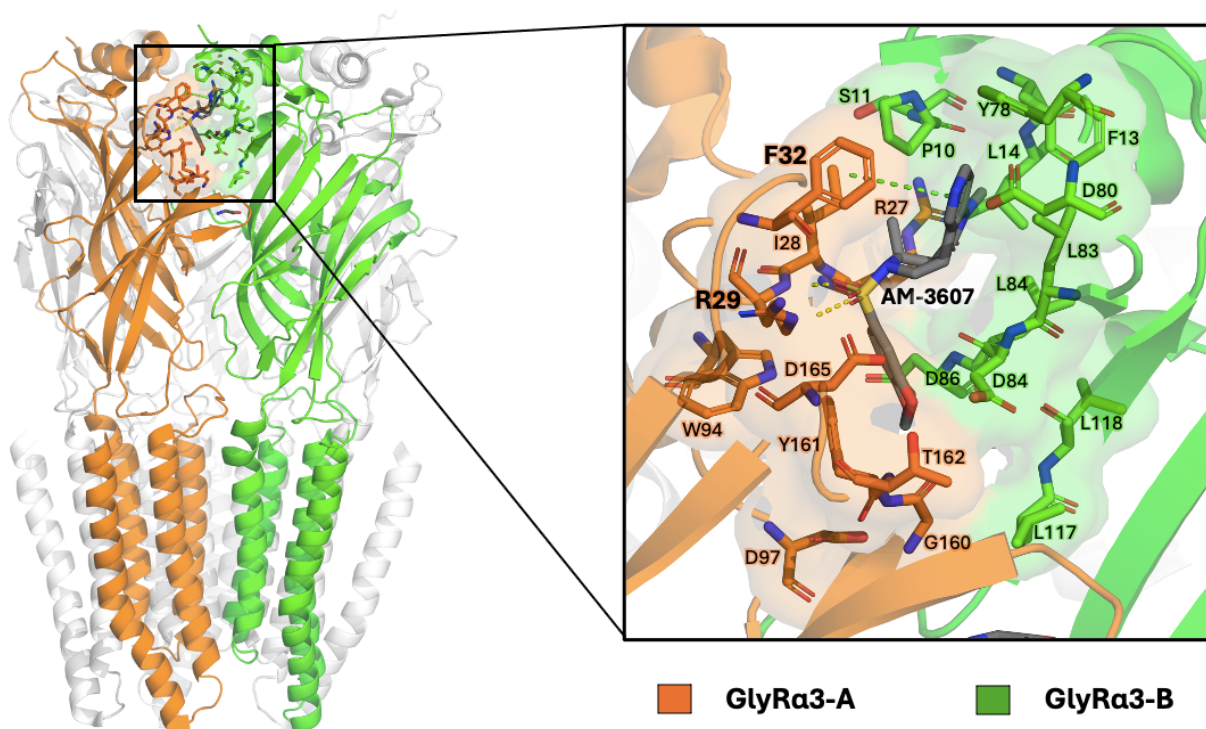


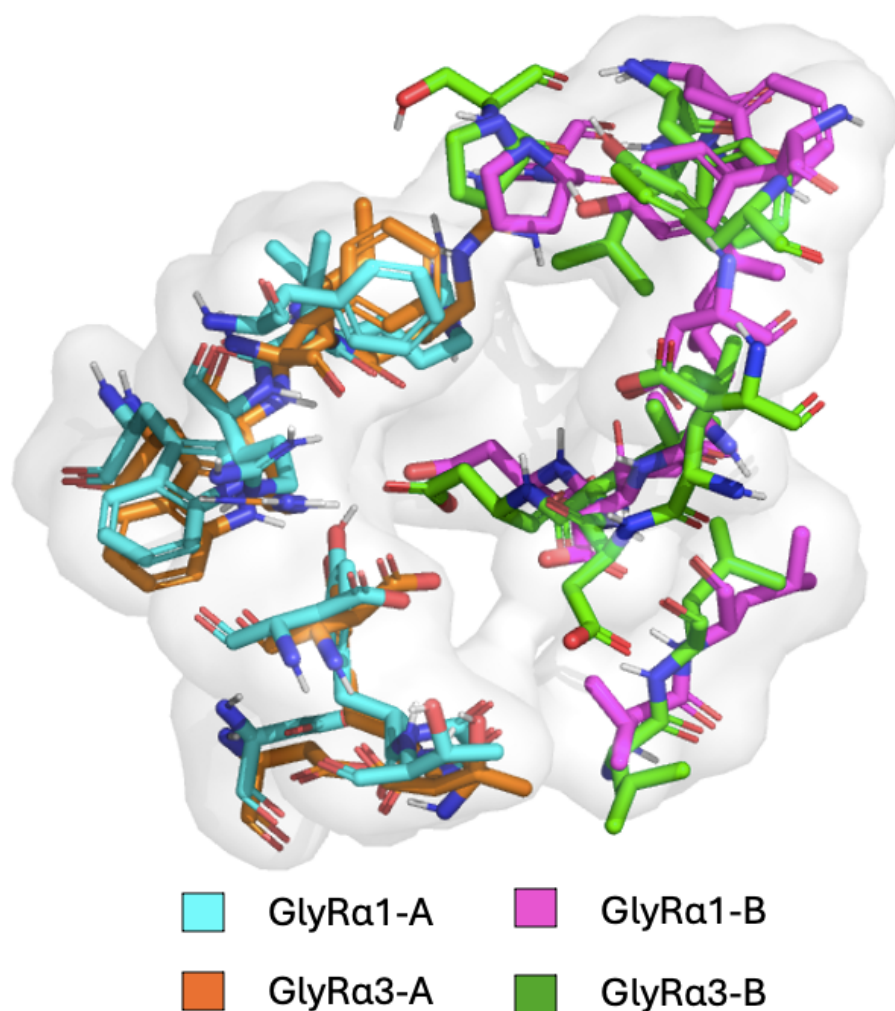
Figura 7. Sitio de unión alostérico de AM-3607 en GlyRa3. Estructura de GlyRa3, destacando las cadenas A (naranja) y B (verde), que muestran mediante un acercamiento el sitio de unión alostérico de AM-3607. Se destacan los residuos que conforman la cavidad, resaltando a R29 y F32 como residuos clave que contribuyen a la estabilización del modulador en el receptor.

5.1.1.3 Alineamiento estructural de GlyRa1, GlyRa3 y cálculo de RMSD

El alineamiento estructural del *backbone* de GlyRa1 y GlyRa3, permitió identificar diferencias a nivel geométrico del sitio de unión alostérico de AM-3607 en el DEC (**Figura 8**). Para evaluar cuantitativamente estas diferencias, se realizó el cálculo del

RMSD (*Root Mean Square Deviation* por sus siglas en inglés) específico para los residuos del sitio de unión, obteniendo un valor de 3.79 Å. Este valor refleja una variación en la disposición espacial de los residuos que conforman dicho sitio al comparar ambas subunidades. Este RMSD corresponde únicamente al área definida por los residuos del sitio de unión, indicando que, aunque ambos receptores presentan una alta conservación en la composición aminoacídica del bolsillo de unión, existen diferencias en la posición espacial de algunos residuos clave que podrían ser determinantes para la interacción con ligandos específicos.

Adicionalmente, se calculó el área del sitio de unión, la cual mostró que GlyR α 3 presenta una cavidad de un tamaño mayor (3017.92 Å²) en comparación a GlyR α 1 (2849.42 Å²), reflejando una diferencia a nivel cuantitativo en el tamaño de la cavidad del sitio alostérico entre ambos receptores. Estos resultados indican que, aunque GlyR α 1 y GlyR α 3 poseen sitios de unión alostéricos estructuralmente conservados, existen ligeras diferencias en la geometría y amplitud del bolsillo alostérico que podrían influir en la accesibilidad de ligandos específicos y en la dinámica de interacción del sitio de unión.



RMSD Sitio de unión: 3.79Å

Figura 8. Sitio de unión alostérico de AM-3607 en GlyRa3. Las cadenas A y B de GlyRa1 están representadas en color cian y magenta, respectivamente, mientras que las cadenas A y B de GlyRa3 están resaltadas en naranja y verde. El RMSD calculado para los residuos del sitio de unión fue de 3.79 Å.

5.1.1.4 Análisis de los residuos del sitio de unión de GlyR α 1 y GlyR α 3

Al comparar individualmente los residuos de las cadenas A y B de las dos subunidades (**Figura 9**), se observó que los residuos de las cadenas A presentaron valores de RMSD inferiores a 2,5 Å (**Figura 9A**). En términos estructurales, valores de RMSD menores a 2.5 Å indican una alta conservación estructural, con disposiciones muy cercanas a la estructura de referencia (Bolhuis, 2006), que en este caso es el sitio de unión de GlyR α 3. Esto sugiere que estos residuos poseen una posición espacial altamente conservada, lo cual podría favorecer interacciones consistentes y estables con el ligando. En contraste, la mayoría de los residuos de las cadenas B (excepto P10, L117, L118) presentaron valores de RMSD superiores a 2,5 Å (**Figura 9B**), indicando variaciones conformacionales relevantes que diferencian el sitio de unión de GlyR α 1 y GlyR α 3. La conservación total de los residuos que conforman el sitio de unión refuerza su papel como elementos estructurales esenciales para la formación del bolsillo alostérico. Sin embargo, las diferencias conformacionales observadas, principalmente en la cadena B, señalan variaciones específicas que podrían influir en que se presente una interacción diferencial de estos receptores con ligandos específicos.

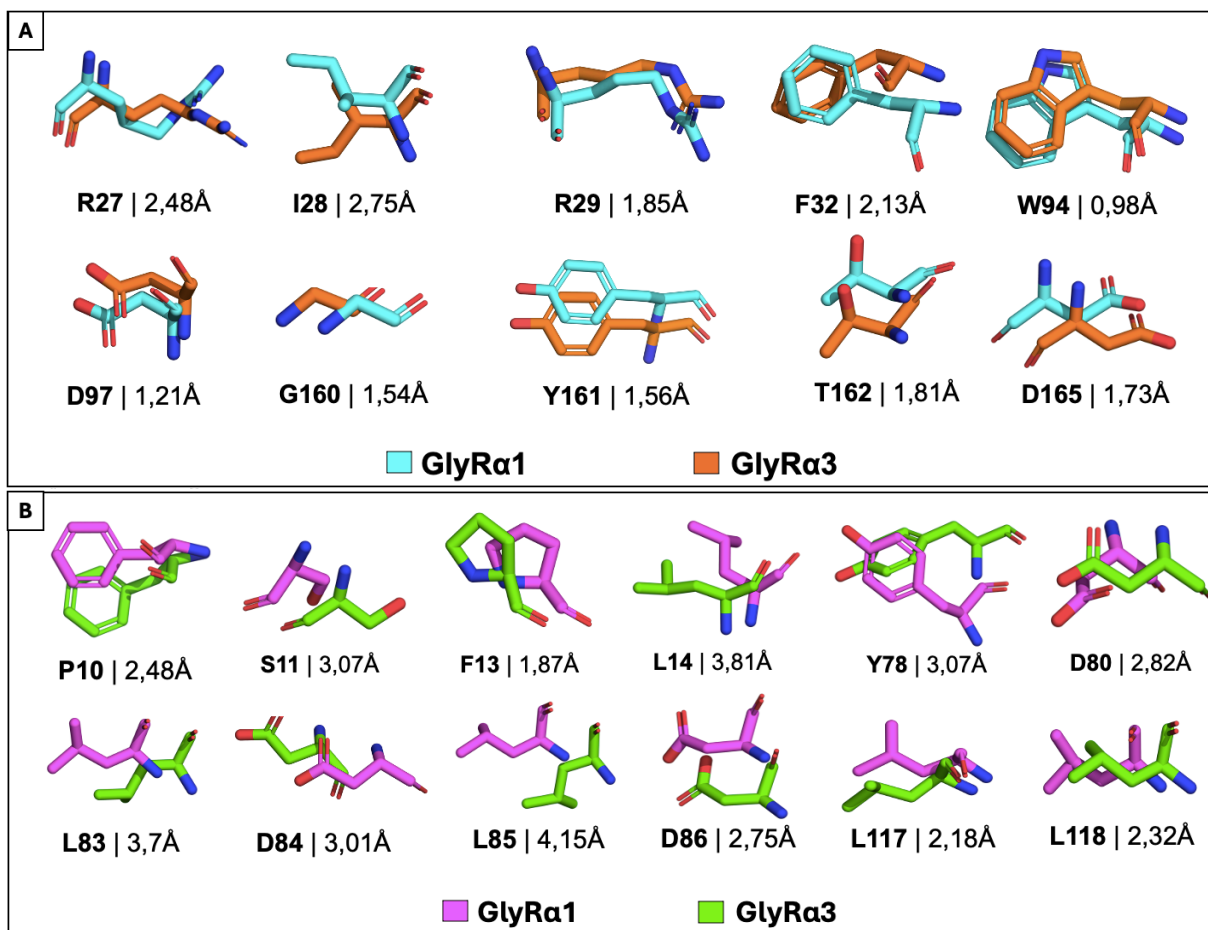


Figura 9. Representación comparativa de los residuos que forman el sitio de unión de AM-3607 en GlyRa1 y GlyRa3. A) Residuos del sitio de unión de las cadenas A de GlyRa1 (cian) y GlyRa3 (naranja). B) Residuos del sitio de unión de las cadenas B de GlyRa1 (magenta) y GlyRa3 (verde), con sus respectivos valores de RMSD.

5.1.2 Diseño computacional de derivados de sulfonamidas con anillos de THQs

El diseño computacional de sulfonamidas con anillos de THQs fue fundamental para generar potenciales MAPs que puedan tener selectividad frente a GlyR α 3. Dado que AM-3607 ha sido reportado como un MAP de GlyR α 3 (Bregman et al., 2017), se buscó diseñar compuestos estructuralmente similares que optimizaran la interacción con el sitio de unión de GlyR α 3.

5.1.2.1 Diseño de núcleos de sulfonamidas y generación de quimioteca

El diseño computacional de derivados de sulfonamidas con anillos de THQ se desarrolló como una estrategia racional para identificar moléculas con potencial como MAPs de GlyR α 3. Inicialmente, se construyeron siete núcleos base (*cores*) diseñados para maximizar la diversidad estructural y favorecer múltiples interacciones potenciales con el sitio de unión alostérico de GlyR α 3 (**Figura 10**). Estos núcleos permitieron explorar un amplio rango de combinaciones mediante la incorporación de sustituciones selectivas en los grupos R. El grupo 1, correspondiente a R₁ y R₂, incluyó sustituciones por hidrógeno (H), metilo (CH₃), nitro (NO₂) y flúor (F). El grupo 2, compuesto por R₃, R₄ y R₅, incorporó hidrógeno (H), metilo (CH₃), metoxi (OCH₃), trifluorometilo (CF₃) y trifluorometoxi (OCF₃) (**Figura 10**).

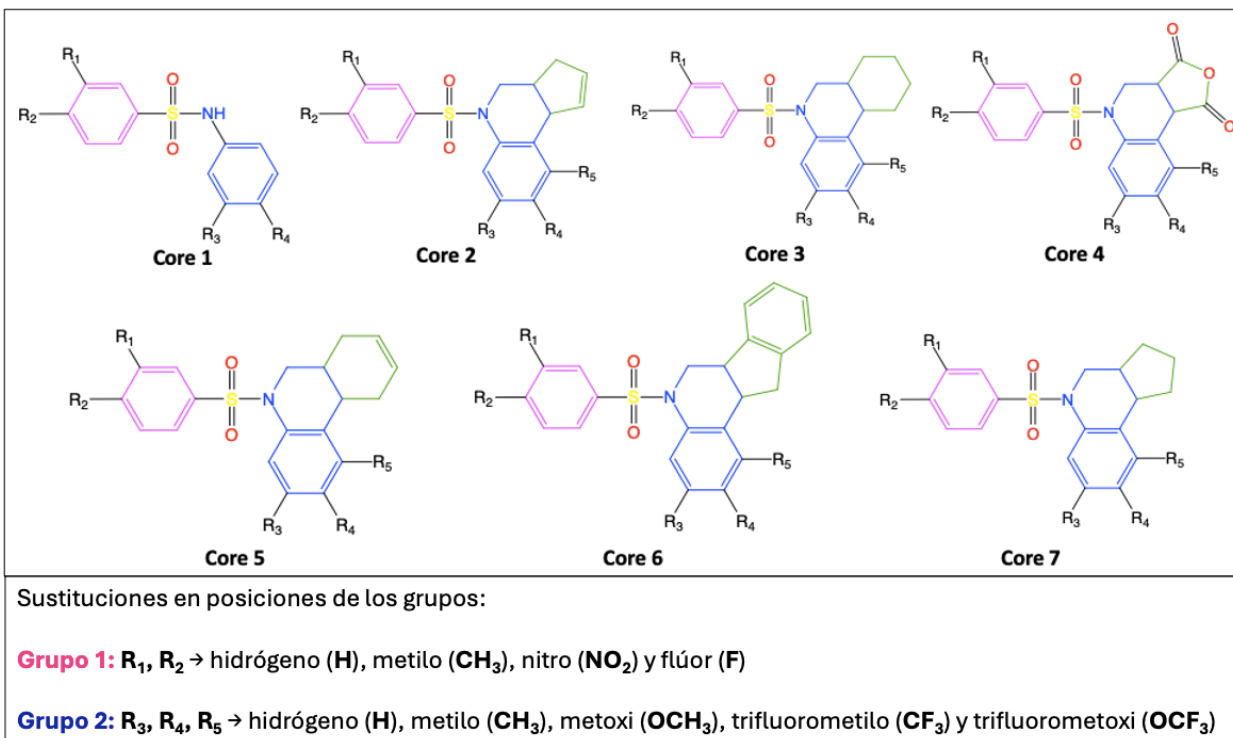


Figura 10. Diseño de núcleos de sulfonamidas con anillos de THQ) y sus grupos R. Representación de siete núcleos base (Cores 1 a 7), cada uno compuesto por un grupo bencenosulfonamida (magenta) y un heterociclo de THQ (azul), sustituido con diferentes tipos de anillos (verde). Se indican las posibles sustituciones en las posiciones R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 .

Estas combinaciones generaron inicialmente una quimioteca computacional de 621 sulfonamidas con anillos de THQ, diseñada para abarcar una amplia diversidad estructural y evaluar la forma en que interactúa con GlyR α 3. Posteriormente, estas moléculas fueron alineadas en el sitio de unión alostérico utilizando como referencia la

posición de AM-3607 en el cristal, con el fin de evaluar su compatibilidad espacial y establecer una orientación inicial favorable. Este proceso fue complementado con estudios de docking molecular, durante los cuales se identificaron múltiples soluciones de posicionamiento y orientación (poses alternativas) para cada molécula, aumentando así el conjunto total evaluado a 1564 estructuras. Esta expansión del número de estructuras permitió realizar un análisis más exhaustivo de los modos de unión potencialmente favorables de cada sulfonamida diseñada, enriqueciendo significativamente el análisis computacional dirigido al descubrimiento de nuevos MAPs para GlyR α 3.

5.1.2.2 Evaluación de la energía libre de unión (ΔG_{Bind}) de las sulfonamidas con anillos THQ diseñadas

La energía libre de unión (ΔG_{Bind}) calculada para las soluciones de docking molecular de las sulfonamidas diseñadas se presenta en un gráfico de dispersión organizado por los siete núcleos base (*cores*) (**Figura 11**). Cada punto en el gráfico corresponde al ΔG_{Bind} de una solución de docking específica de las sulfonamidas con anillos de THQ diseñadas en la quimioteca, ofreciendo una visualización clara de la estabilidad de unión asociada a cada núcleo estructural al que pertenece.

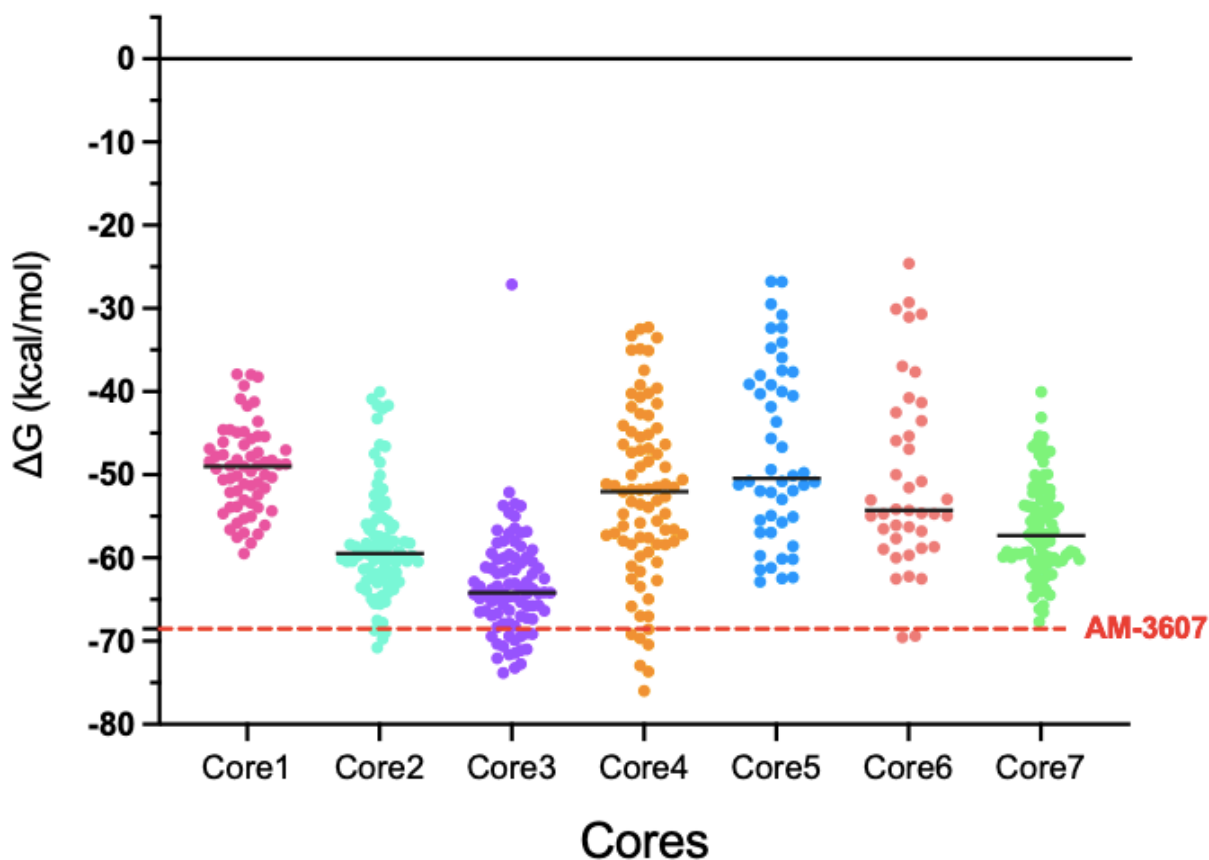


Figura 11. Distribución de la energía libre de unión (ΔG_{Bind}) de las sulfonamidas generadas por núcleo estructural. Se muestran los valores de ΔG_{Bind} obtenidos para las 1564 soluciones de docking obtenidas, agrupadas por los siete núcleos base (cores). La línea roja punteada marca el valor de ΔG_{Bind} del ligando de referencia AM-3607 (-68,53 kcal/mol).

El valor de ΔG_{Bind} del ligando de referencia AM-3607 (-68.53 kcal/mol), señalado en el gráfico por la línea roja punteada (**Figura 11**), se utilizó como criterio comparativo para evaluar la afinidad de las moléculas diseñadas. Se observó que varias sulfonamidas presentaron valores de ΔG_{Bind} más negativos que AM-3607, lo que indica que estas

moléculas tienen interacciones que favorecen su unión y estabilidad en el sitio de unión alostérico de GlyR α 3, destacando su potencial como MAPs.

La evaluación de ΔG_{Bind} mostró variaciones entre los diferentes *cores*, reflejando la diversidad química y conformacional de la quimioteca generada. Los *cores* 2, 3, 4 y 6 presentaron sulfonamidas con valores de ΔG_{Bind} cercanos o inferiores al de AM-3607, destacando el *core* 3 como el que concentró el mayor número de compuestos con mejor afinidad que el ligando de referencia (**Figura 11**), indicando que posee características estructurales, especialmente favorables para la interacción efectiva con GlyR α 3. Además de identificar las sulfonamidas con anillos de THQ que mostraron los valores de ΔG_{Bind} más favorables dentro de la quimioteca, el análisis permitió reconocer patrones estructurales clave que podrían optimizarse en futuros diseños para mejorar la interacción con el receptor. En este sentido, los resultados permitieron definir qué núcleos estructurales favorecen interacciones más estables con GlyR α 3.

5.1.2.3 Identificación de las sulfonamidas con anillos de THQ con mayor estabilidad de unión a GlyR α 3

Para identificar las sulfonamidas con el perfil energético más favorable de la quimioteca generada, se realizó un análisis del $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$, definido como la diferencia entre la energía libre de unión de las moléculas diseñadas y la del ligando de referencia AM-3607 (-68,53 kcal/mol). Este análisis permitió identificar 29 sulfonamidas con mejor estabilidad de unión en el sitio alostérico de GlyR α 3 (**Figura 12**), con valores de

$\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ más negativos, lo que indica interacciones más estables en comparación con AM-3607.

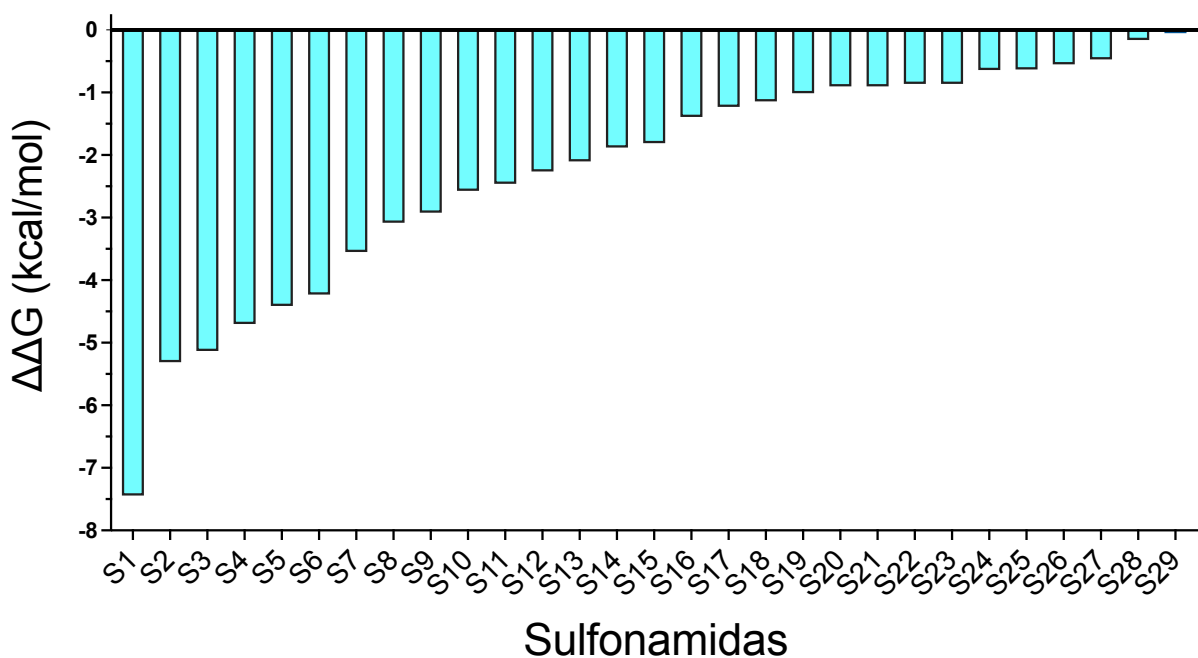
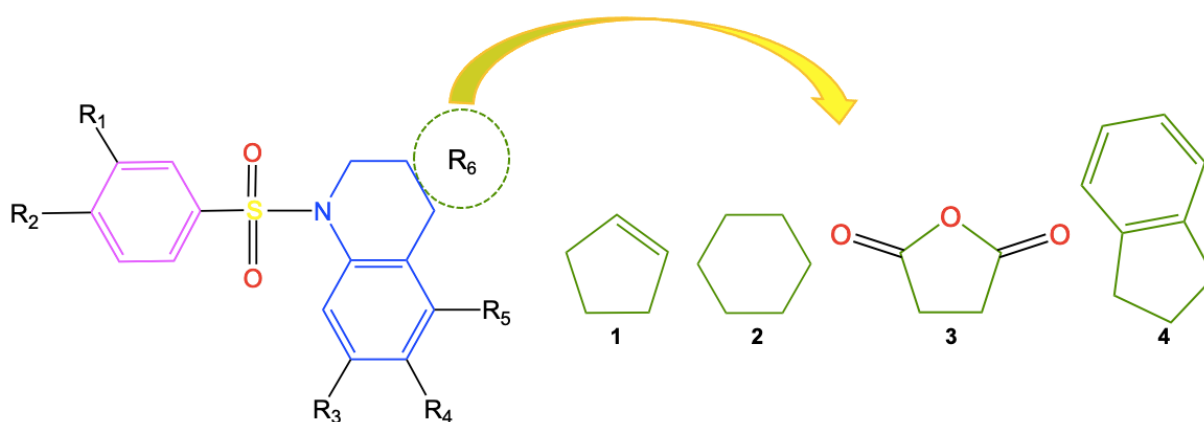


Figura 12. Evaluación energética de los derivados de sulfonamidas con anillos de THQ con mejor estabilidad en el sitio alostérico de GlyR α 3. Valores de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ de las 29 sulfonamidas con energía de unión más favorable que la del ligando de referencia AM-3607.

En la **Tabla 1** se presenta el análisis detallado de las 29 sulfonamidas con anillos de THQ más prometedoras, incluyendo sus valores de ΔG_{Bind} y $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$, así como las

combinaciones específicas de grupos R en las posiciones correspondientes de los *cores*.

Tabla 1. Sulfonamidas con anillos de THQ identificadas con mayor estabilidad de unión a GlyR α 3. Se incluyen los valores de ΔG_{Bind} y $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ junto con la información detallada de los *cores*, cada uno compuesto por un grupo bencenosulfonamida (magenta) con sustituciones en R1 y R2 (H, CH3, NO2, F), y un heterociclo de THQ (azul) con sustituciones en R3, R4 y R5 (H, CH3, OCH3, CF3, OCF3) con anillos sustituidos por R6 (verde).



Identificador sulfonamida	Core	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	ΔG_{Bind} (kcal/mol)	MM-GBSA ($\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$) (kcal/mol)
S1	4	H	CH ₃	H	H	H	3	-75.97	-7.44
S2	3	H	CH ₃	H	CH ₃	H	2	-73.84	-5.31
S3	4	H	NO ₂	H	H	CH ₃	3	-73.66	-5.13
S4	3	NO ₂	H	OCF ₃	H	H	2	-73.23	-4.70
S5	4	H	F	H	H	H	3	-72.94	-4.41
S6	3	H	NO ₂	OCF ₃	H	H	2	-72.76	-4.23
S7	3	H	NO ₂	H	H	CH ₃	2	-72.08	-3.55

S8	3	F	H	CH ₃	H	H	2	-71.61	-3.08
S9	3	H	NO ₂	H	CH ₃	H	2	-71.45	-2.92
S10	3	H	NO ₂	H	OCF ₃	H	2	-71.10	-2.57
S11	3	NO ₂	H	OCF ₃	H	H	2	-70.99	-2.46
S12	2	NO ₂	H	OCH ₃	H	H	1	-70.79	-2.26
S13	3	H	NO ₂	H	CF ₃	H	2	-70.63	-2.10
S14	4	H	NO ₂	CH ₃	H	H	3	-70.41	-1.88
S15	3	H	NO ₂	CH ₃	H	H	2	-70.34	-1.81
S16	3	H	NO ₂	H	H	H	2	-69.92	-1.39
S17	2	H	CH ₃	OCH ₃	H	H	1	-69.76	-1.23
S18	4	H	F	CH ₃	H	H	3	-69.67	-1.14
S19	6	H	H	H	CH ₃	H	4	-69.54	-1.01
S20	3	F	H	H	OCH ₃	H	2	-69.43	-0.90
S21	3	NO ₂	H	OCH ₃	H	H	2	-69.43	-0.90
S22	3	H	NO ₂	H	OCH ₃	H	2	-69.39	-0.86
S23	6	F	H	H	CH ₃	H	4	-69.39	-0.86
S24	4	H	H	CH ₃	H	H	3	-69.17	-0.64
S25	3	H	NO ₂	H	OCH ₃	H	2	-69.16	-0.63
S26	3	H	CH ₃	CH ₃	H	H	2	-69.08	-0.55
S27	2	H	CH ₃	H	CH ₃	H	1	-69.00	-0.47
S28	2	H	NO ₂	H	CH ₃	H	1	-68.69	-0.16
S29	4	H	CH ₃	H	H	OCF ₃	3	-68.58	-0.05

ΔG_{Bind} ligando co-cristalizado AM-3607: -68.53 (kcal/mol)

En particular, se observó que las sulfonamidas con anillos de THQ derivadas de los *cores* 2, 3 y 4 tienen los valores de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ más favorables, lo que resalta la relevancia de sus configuraciones químicas específicas para estabilizar la unión con el receptor. Entre las sulfonamidas que más destacan, las derivadas del *core* 4 predominaron, seguidas por las de los *cores* 3 y 2 (**Tabla 1**). La sulfonamida identificada como S1, del *core* 4 presentó el valor más negativo de ΔG_{Bind} (-75.97 kcal/mol), consolidándose como la que tiene mayor estabilidad de unión dentro de la quimioteca. De manera similar, las sulfonamidas S2 y S3, derivadas de los *cores* 3 y 4, respectivamente, registraron valores de ΔG_{Bind} (-73.84 y -73.66 kcal/mol, respectivamente) cercanos a los de S1 (**Tabla 1**), reforzando la relevancia de estas configuraciones estructurales.

Estas sulfonamidas fueron consideradas como candidatos prometedores para realizar estudios experimentales adicionales, dirigidos a validar su potencial como MAPs de GlyR α 3.

A partir de estos resultados, se evaluó la viabilidad experimental de las moléculas identificadas en colaboración con el Laboratorio de Diseño y Síntesis de Compuestos Bioactivos. Esta evaluación permitió determinar qué sulfonamidas podían avanzar a la fase de síntesis, considerando tanto su perfil energético como la factibilidad sintética. Las sulfonamidas derivadas del *core* 1 fueron descartadas debido a sus energías de unión poco favorables, lo que no justificaba el esfuerzo sintético. En cuanto a las del *core* 3, aunque prometedoras en términos energéticos, no fueron consideradas debido a la falta de condiciones sintéticas óptimas en el laboratorio, lo que implicaba invertir un tiempo adicional considerable para su desarrollo. De manera similar, los *cores* 5, 6 y 7 fueron excluidos, ya que sus valores energéticos eran poco competitivos en comparación con los demás núcleos estructurales.

Por estas razones, se tomó la decisión de priorizar la síntesis de moléculas derivadas de los *cores* 2 y 4, que no solo mostraron energías de unión altamente favorables, sino que además se contaba con metodologías de síntesis adecuadas para la obtención de estos compuestos en el Laboratorio de Diseño y Síntesis de Compuestos Bioactivos. Para optimizar su potencial farmacológico y asegurar su síntesis, se realizaron ajustes estratégicos en las posiciones y los sustituyentes de los grupos R, basados en los resultados computacionales y en la viabilidad sintética. Estas modificaciones

permitieron generar una nueva quimioteca complementaria de moléculas derivadas de los *cores* 2 y 4, optimizando tanto su viabilidad experimental como su diversidad química (**Figura 13**).

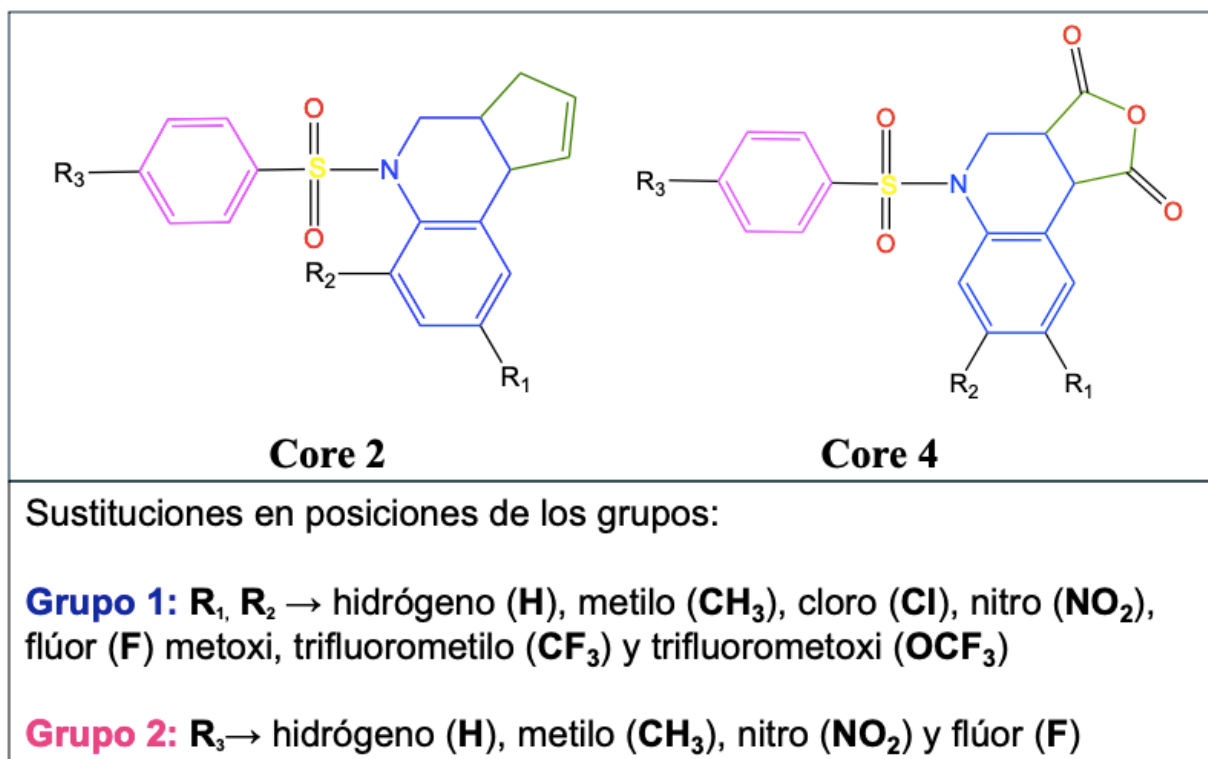


Figura 13. Optimización de las posiciones y sustituyentes en los grupos R de los cores 2 y 4 para la generación de la quimioteca complementaria. Modificaciones implementadas a los *cores* 2 y 4 seleccionados para síntesis, mostrando los sustituyentes en R_1, R_2 (H, CH_3 , Cl, NO_2 , F, CF_3 , OCF_3) y R_3 (H, CH_3 , NO_2 , F). Cada *core* se compone de un grupo bencenosulfonamida (magenta) y un heterociclo de THQ (azul), sustituido con diferentes anillos (verde).

Este enfoque integrado, que combinó el análisis computacional con la evaluación de viabilidad sintética, facilitó una transición efectiva hacia la etapa experimental, permitiendo centrar los esfuerzos en la síntesis de sulfonamidas con un balance óptimo entre estabilidad de unión y accesibilidad sintética.

5.1.2.4 Optimización y selección de sulfonamidas con anillos de THQ derivadas de los cores 2 y 4

Tras implementar las modificaciones estructurales propuestas para los *cores* 2 y 4 y seguir la metodología previamente establecida para la generación de la quimioteca inicial, se desarrolló la quimioteca complementaria (**Figura 14**). Para evaluar la estabilidad de unión de las moléculas optimizadas, se realizó docking molecular y se evaluó la energía libre de unión (ΔG_{Bind}) para las soluciones obtenidas por *core* (**Figura 14A**). Los resultados mostraron que únicamente las sulfonamidas derivadas del *core* 2 alcanzaron valores de energía de unión favorables, mientras que las moléculas del *core* 4 no lograron superar este umbral energético. Posteriormente, se calculó el $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ para identificar las sulfonamidas con mayor estabilidad energética relativa en comparación con el ligando de referencia. Este análisis permitió identificar cinco sulfonamidas del *core* 2 con los valores más negativos de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ (**Figura 14B**).

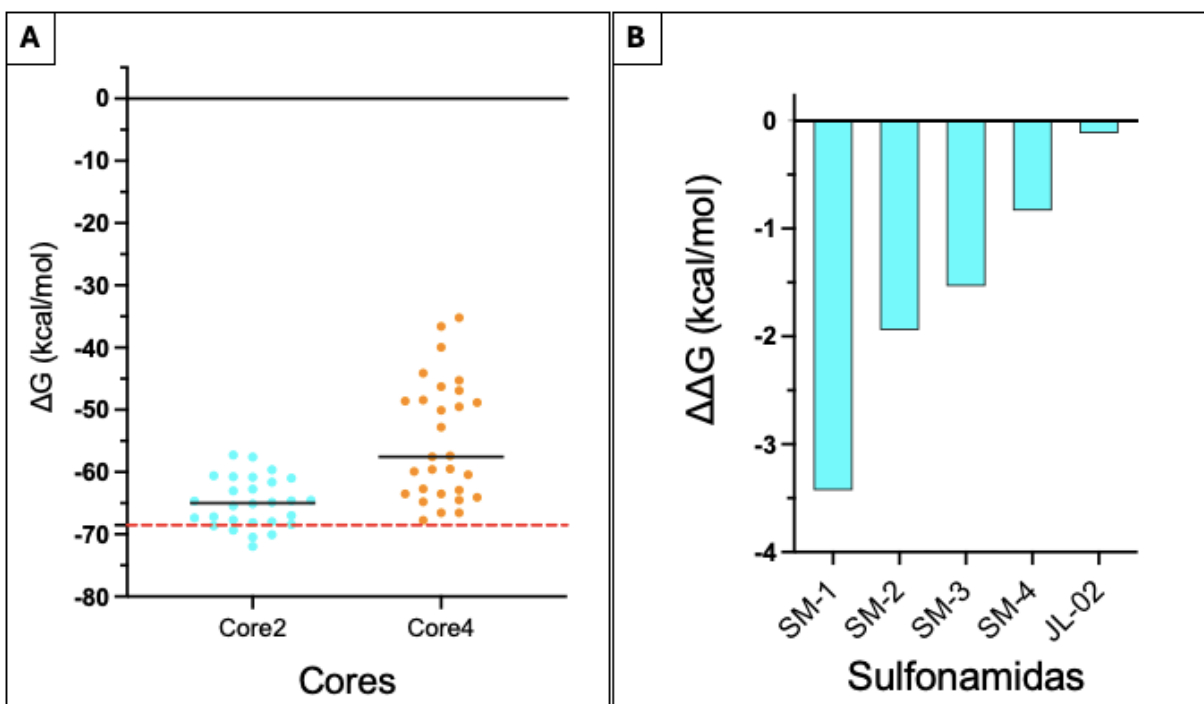
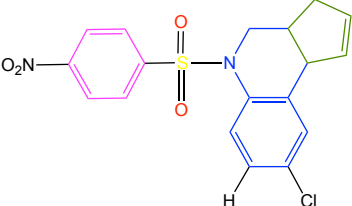
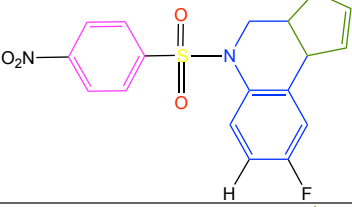
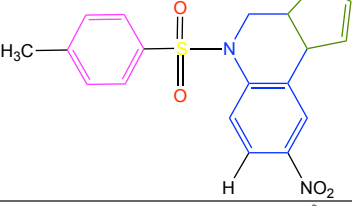
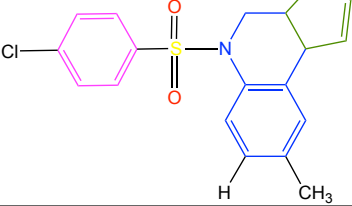


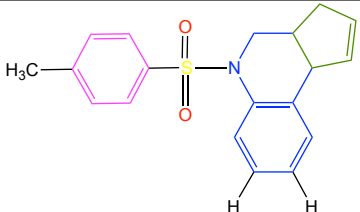
Figura 14. Evaluación energética de las sulfonamidas con anillos de THQ derivadas de los cores 2 y 4 tras las modificaciones estructurales. A) Representación de la energía libre de unión (ΔG_{Bind}) para las sulfonamidas de los *cores* 2 y 4. La línea roja punteada indica el valor de ΔG_{Bind} del ligando de referencia AM-3607 (-68,53 kcal/mol), utilizado como valor de referencia. B) Se presentan las sulfonamidas del *core* 2 con los valores más negativos de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ que AM-3607.

Para examinar las diferencias estructurales entre las sulfonamidas con anillos de THQ que presentaron la mayor estabilidad energética dentro de la quimioteca complementaria, en la **Tabla 2** se representan las cinco moléculas del *core* 2 que presentaron los valores más negativos de $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$. En ella se detallan sus estructuras

químicas, identificadores y los valores de ΔG_{Bind} y $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ obtenidos después del análisis.

Tabla 2. Sulfonamidas con anillos de THQ derivadas del core 2 con mayor estabilidad de unión a GlyR α 3. Se incluyen los valores de ΔG_{Bind} y $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ junto con la información detallada del core 2, formado por un grupo bencenosulfonamida (magenta) unido a un heterociclo de THQ (azul) con un ciclopenteno (verde).

Estructura sulfonamida	Identificador sulfonamida	ΔG_{Bind} (kcal/mol)	MM-GBSA ($\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$) (kcal/mol)
	SM-1	-71.96	-3,43
	SM-2	-70.47	-1,94
	SM-3	-70.06	-1,53
	SM-4	-69.36	-0,83

	JL-02	-68.65	-0,12
---	-------	--------	-------

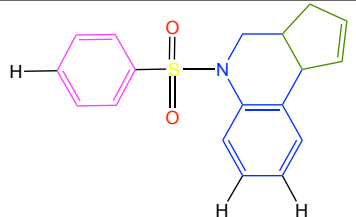
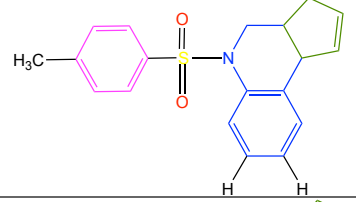
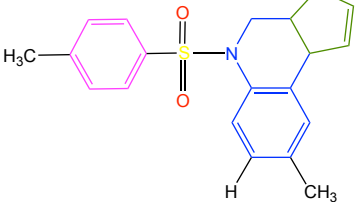
ΔG_{Bind} ligando co-cristalizado AM-3607: -68.53 (kcal/mol)

5.1.2.5 Sulfonamidas con anillos THQ sintetizadas para evaluación experimental

La síntesis de las sulfonamidas con anillos de THQ se llevó a cabo en el Laboratorio de Diseño y Síntesis de Compuestos Bioactivos. Se consideraron tanto los resultados de energía obtenidos para las moléculas de las quimiotecas como su viabilidad sintética. En total, se sintetizaron tres moléculas del *core 2* denominadas como: JL-01 (Core2-H-H-H), JL-02 (Core2-H-H-CH₃) y CO2-1 (Core2-CH₃-H-CH₃) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Sulfonamidas con anillos de THQ sintetizadas y sus parámetros energéticos. Estructuras de las tres sulfonamidas del *core 2* sintetizadas (JL-01, JL-02 y CO2-1) con sus correspondientes valores de ΔG_{Bind} y $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$. Este *core* está formado por un grupo bencenosulfonamida (magenta) unido a un heterociclo de THQ (azul) con un ciclopenteno (verde).

Estructura sulfonamida	Identificador sulfonamida	ΔG_{Bind} (kcal/mol)	MM-GBSA ($\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$) (kcal/mol)
------------------------	---------------------------	--	---

	JL-01	-60.58	7.94
	JL-02	-68.65	-0.12
	CO2-1	-64.61	3.91

ΔG_{Bind} ligando co-cristalizado AM-3607: -68.53 (kcal/mol)

La primera molécula en ser sintetizada fue JL-01 (**Tabla 3**), una sulfonamida de estructura sencilla, que incorpora únicamente hidrógenos como sustituyentes en su estructura. Aunque no se encontraba entre las sulfonamidas con mejor perfil energético, su síntesis permitió evaluar el comportamiento que tiene una estructura mínima en la estabilidad de unión con GlyR α 3. El cálculo de su ΔG_{Bind} (-60.58 kcal/mol) (**Tabla 3**) indicó una menor estabilidad energética en el sitio de unión alostérico en comparación con AM-3607, confirmando la importancia de las modificaciones estructurales en la optimización de la afinidad por GlyR α 3.

Posteriormente, se sintetizó JL-02 (**Tabla 3**), que había sido identificada como la quinta sulfonamida de la **Tabla 2** con los valores de ΔG_{Bind} más negativos de la quimioteca complementaria, caracterizada por tener un grupo metilo unido a la

bencenosulfonamida. Su ΔG_{Bind} de -68.65 kcal/mol (**Tabla 3**) fue consistente con la energía de AM-3607 (-68.53 kcal/mol), validando su estabilidad en el sitio de unión de GlyR α 3. Finalmente, se sintetizó CO2-1 (**Tabla 3**), otra molécula del *core* 2, que si bien no se encontraba entre las más favorables en términos energéticos, su síntesis permitió evaluar el efecto de la interacción de dos grupos metilo con GlyR α 3. Su ΔG_{Bind} de -64.61 kcal/mol (**Tabla 3**), aunque no tan negativo como el de JL-02, resultó relativamente cercano al del ligando de referencia, lo que sugiere una estabilidad intermedia.

Tras la síntesis, se procedió con la evaluación experimental de las sulfonamidas para analizar su afinidad por GlyR α 3. Estos resultados permitieron relacionar los análisis computacionales con las propiedades estructurales de las moléculas sintetizadas, destacando el impacto de las modificaciones estructurales en la estabilidad de la interacción y la importancia del diseño computacional en la selección de candidatos viables para la síntesis.

5.2 OE2: Caracterizar el modo de unión de los derivados de sulfonamidas con anillos de anillos de tetrahydroquinolinas mediante simulaciones de dinámica molecular

5.2.1 Análisis de dinámica molecular y estabilidad conformacional de GlyR α 3 en complejo con AM-3607, JL-02 y CO2-1

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de producción de 500 ns para analizar la estabilidad conformacional y las interacciones moleculares de GlyR α 3 en complejo con los compuestos sintetizados JL-02 y CO2-1, así como el ligando de referencia AM-3607 (**Figura 15**). Dado que JL-01 mostró un ΔG_{Bind} poco favorable, no fue incluido en estos análisis. Estas simulaciones permitieron evaluar el comportamiento dinámico de los ligandos en el sitio de unión alostérico y su capacidad para mantener una interacción estable con el receptor.

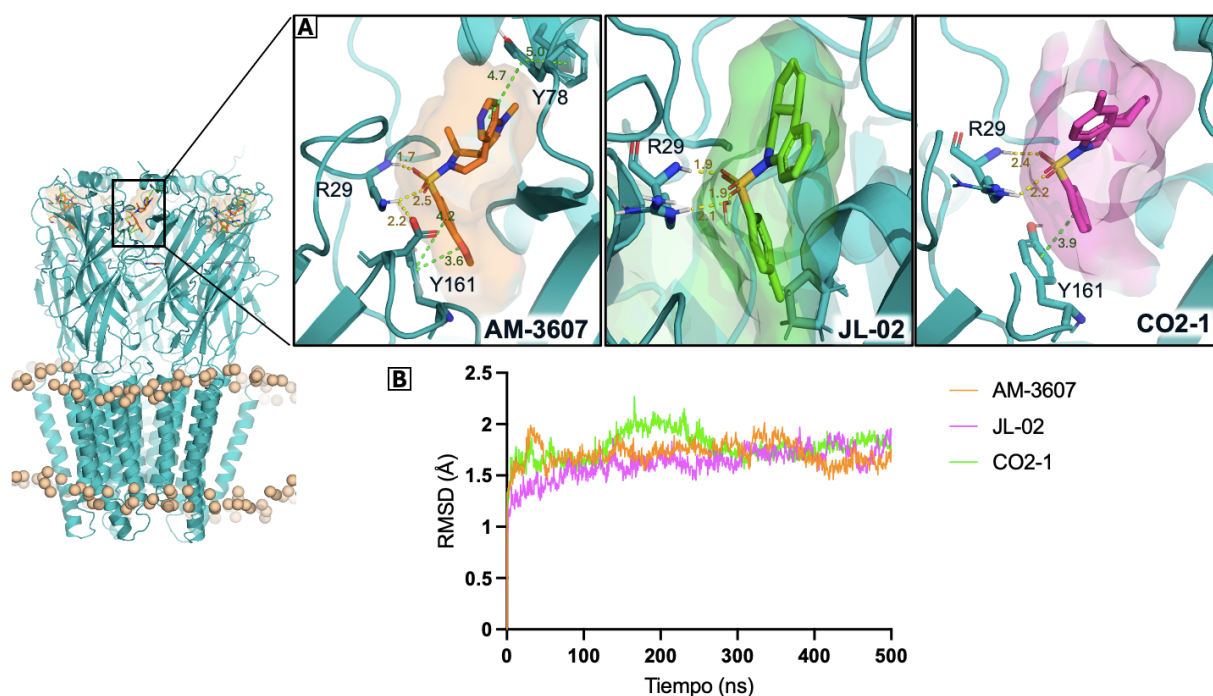


Figura 15. Representaciones estructurales y RMSD de GlyR α 3 en complejo con AM-3607, JL-02 y CO2-1. A) Estructuras representativas obtenidas tras 500 ns de la dinámica molecular de producción de GlyR α 3 en complejo con AM-3607 (ligando de referencia), JL-02 y CO2-1 (moléculas sintetizadas). Se realiza un acercamiento al sitio

de unión alostérico para cada molécula, en el que se observan mediante líneas punteadas interacciones de tipo enlaces de hidrógeno (amarillas) y pi-pi (verdes) de los ligandos con residuos clave con sus respectivas distancias de enlace en Ångström (Å) . B) RMSD de los átomos del *backbone* de la dinámica molecular de producción de 500ns de GlyRα3 con los ligandos AM-3607 (naranja), JL-02 (magenta) y CO2-1 (verde).

Las representaciones tridimensionales obtenidas a los 500ns de las simulaciones (**Figura 15A**) evidenciaron que tanto el ligando de referencia AM-3607 como JL-02 y CO2-1, establecieron enlaces de hidrógeno con R29 hasta el final de la simulación. Esta interacción fue esencial para mantener la unión de los ligandos al sitio alostérico de GlyRα3 y favorecer la estabilidad del complejo receptor-ligando. Además, AM-3607 formó interacciones de tipo pi-pi con Y161 y Y78, las cuales también se generaron con el residuo R29 y la molécula CO2-1. La conservación de interacciones de este tipo en las simulaciones sugiere que JL-02 y CO2-1 logran un anclaje adecuado en el sitio de unión, comparable al del ligando de referencia AM-3607.

El análisis del RMSD a lo largo de la simulación (**Figura 15B**) permitió evaluar la estabilidad conformacional de los átomos del *backbone* de GlyRα3 al interactuar con AM-3607, JL-02 y CO2-1. Durante los primeros 100 ns, se observó una variación inicial en los valores de RMSD en los tres sistemas, lo cual es característico del proceso de relajación estructural tras la etapa de equilibrado. A partir de los 250 ns, los valores de

RMSD se mantuvieron dentro de un rango estable por debajo de 2.5 Å, lo que indica una alta conservación y estabilidad estructural del receptor en presencia de los ligandos a lo largo de la simulación (Bolhuis, 2006).

El complejo GlyR α 3-AM-3607 mostró una variación mínima en el RMSD (**Figura 15B**), lo que sugiere que en el tiempo de simulación de 500ns la interacción con el ligando de referencia estabiliza el sitio alostérico sin inducir cambios estructurales significativos en el receptor. De manera similar, los complejos con JL-02 y CO2-1 presentaron perfiles de estabilidad comparables al de AM-3607 (**Figura 15B**), con fluctuaciones dentro del mismo rango. Estos resultados confirman que ambos ligandos interactúan de manera estable con GlyR α 3, replicando la dinámica observada para el ligando de referencia.

En conjunto, los tres complejos alcanzaron un equilibrio estructural estable, manteniendo la conservación de la conformación del receptor en presencia de los ligandos. La similitud en los perfiles de estabilidad entre JL-02, CO2-1 y AM-3607 refuerza la capacidad de las nuevas sulfonamidas desarrolladas con anillos de THQ para interactuar de manera estable con GlyR α 3, respaldando su potencial como MAPs. Para profundizar en su contribución a la estabilización del complejo, se analizó la frecuencia de sus interacciones con residuos clave del sitio alostérico a lo largo de la simulación.

5.2.2 Interacciones moleculares de AM-3607, JL-02 y CO2-1 en el sitio alostérico de GlyR α 3

El análisis de la frecuencia de interacciones entre los ligandos AM-3607, JL-02 y CO2-1 con los residuos del sitio alostérico de GlyR α 3 (**Figura 16**) permitió caracterizar los contactos moleculares responsables de la estabilización de cada complejo a lo largo de la simulación. Se identificaron interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, interacciones pi-pi, enlaces de hidrógeno aromáticos y contactos pi-cación, proporcionando una visión integral sobre la dinámica de unión de cada ligando.

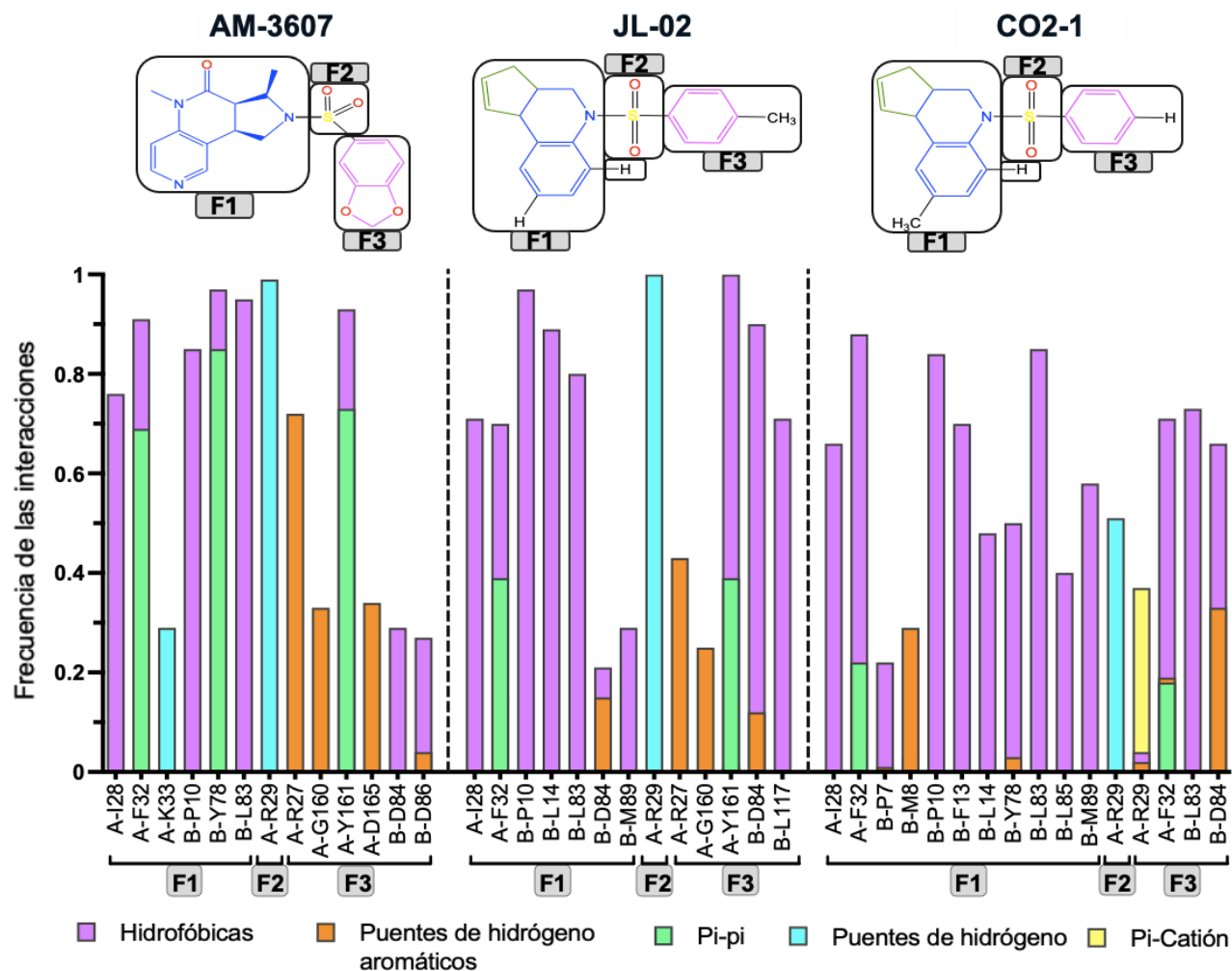


Figura 16. Frecuencia de interacciones entre los ligandos AM-3607, JL-02 y CO2-1 con GlyRα3. Distribución de la frecuencia de interacciones moleculares observadas durante la simulación de dinámica molecular de 500 ns para los complejos de GlyRα3 con AM-3607, JL-02 y CO2-1. Se presentan interacciones hidrofóbicas (lila), enlaces

de hidrógeno aromáticos (naranja), interacciones pi-pi (verde), enlaces de hidrógeno (turquesa) y contactos pi-cación (amarillo).

Para evaluar detalladamente las interacciones, cada ligando fue fragmentado en tres partes (F1, F2 y F3) las cuales se relacionaron con los residuos identificados en el sitio alostérico. Solo se muestran las interacciones ocurridas entre las cadenas A y B del receptor, seleccionadas como representación del comportamiento global del sistema. La letra que precede a cada residuo indica la cadena a la que pertenece (A o B).

El ligando de referencia AM-3607 presentó una alta estabilidad en el sitio alostérico, con interacciones diferenciadas en función de sus fragmentos estructurales (**Figura 16**). Su anillo de pirrolidina-naftiridona (F1) estableció interacciones hidrofóbicas con A-I28, B-P10, B-L83 y en menor medida con A-F32 y B-Y78, además de interacciones pi-pi con A-F32 y B-Y78. El grupo sulfonamida (F2) mantuvo una alta frecuencia de enlaces de hidrógeno con A-R29, una interacción clave en la modulación del receptor (Huang et al., 2015). Su benzodioxolona (F3) establecieron enlaces de hidrógeno aromáticos con A-R27 y, en menor frecuencia, con A-G160 y B-D86, además de interacciones pi-pi con A-Y161 y contactos hidrofóbicos con A-Y161, B-D84 y B-D86, favoreciendo su retención dentro del sitio de unión.

JL-02 presentó una mayor frecuencia de interacciones hidrofóbicas que AM-3607, lo que contribuyó a su estabilización en el sitio alostérico (**Figura 16**). Su heterociclo de THQ (F1) estableció interacciones hidrofóbicas con los residuos A-I28, B-P10, B-L14,

B-L83 y en menor medida con A-F32, B-M84 y B-M89, además de interacciones pi-pi con A-F32 y enlaces de hidrógeno aromáticos con B-D84, lo que favoreció su anclaje al receptor. Su grupo sulfonamida (F2) mantuvo una interacción estable con A-R29 mediante enlaces de hidrógeno, reforzando su similitud con AM-360. El fragmento benceno (F3) presentó interacciones hidrofóbicas con A-Y161, B-D84 y B-L117 que tuvieron una mejor frecuencia de interacción que con AM-3607, aunque con una menor frecuencia de enlaces de hidrógeno aromáticos (A-R27, A-G160, B-D84) y solo interacciones pi-pi con A-Y161.

CO2-1 mostró un patrón de interacciones más dinámico, con una mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas en su fragmento THQ (F1) que los demás ligandos (**Figura 16**), interactuando con A-I28, A-F32, B-P7, B-P10, B-F13, B-L14, B-Y78, B-L83, B-L85 Y B-M89. Su grupo equiparable a la de los otros ligandos. Además, A-R29 estableció otras interacciones con el fragmento de benceno (F3) que incluyen contactos hidrofóbicos, pi-cación y enlaces de hidrógeno aromáticos. Este fragmento (F3) también generó contactos hidrofóbicos con A-F32, B-L83 y B-D84, enlaces de hidrógeno aromáticos con A-F32 y B-D84 e interacciones pi-pi con A-F32. La reducción en la frecuencia de interacciones pi-pi y enlaces de hidrógeno aromáticos podría afectar su estabilidad en el sitio de unión, lo que coincide con su valor de estabilidad energética.

Los resultados de las dinámicas moleculares muestran que JL-02 presentó un patrón de interacción similar al de AM-3607, tanto en términos de estabilidad conformacional

como en la persistencia de interacciones clave con el sitio alostérico de GlyR α 3. Esto respalda su potencial como un candidato prometedor para el desarrollo de MAPS dirigidos a GlyR α 3. Aunque CO2-1, presenta una dinámica más variable que AM-3607 y JL-02, su capacidad para interactuar con residuos clave indica que mantiene un modo de unión viable en GlyR α 3. Estos hallazgos resaltan la importancia de las interacciones específicas de cada fragmento en la estabilización del complejo ligando-receptor, resaltando como la composición estructural de las sulfonamidas con anillos de THQ en su actividad como potenciales MAPs de GlyR α 3.

5.3 OE3: Evaluar la actividad biológica de las sulfonamidas diseñadas mediante registros electrofisiológicos del receptor de glicina α 3 fosforilado

5.3.1 Evaluación electrofisiológica de los derivados de sulfonamidas sintetizadas en GlyR α 3

Para determinar el efecto funcional de las sulfonamidas diseñadas y sintetizadas, se realizaron registros electrofisiológicos en células HEK293 transfectadas con GlyR α 3 en estado silvestre (WT) y su mutante fosfomimética S346E. Se llevaron a cabo ensayos de célula completa (*whole-cell*) utilizando glicina como agonista principal en combinación con las sulfonamidas sintetizadas JL-02 y CO2-1, seleccionadas no solo por sus propiedades estructurales y energéticas, previamente caracterizadas en los estudios bioinformáticos, sino también por su viabilidad sintética.

Además, se incluyeron dos moléculas adicionales que también fueron sintetizadas bajo este proyecto: SAM-1, un precursor de las sulfonamidas diseñadas que, debido a su estructura, no se esperaba que presentara actividad sobre el receptor; y JL-01, cuyo cálculo de energía libre de unión había indicado una baja estabilidad en el sitio alostérico, lo que sugería la ausencia de efecto funcional significativo. La evaluación experimental permitió evaluar la correlación entre las predicciones *in silico* con la actividad experimental, estableciendo las bases para la selección de derivados de sulfonamidas con anillos de THQ con potencial modulador sobre GlyR α 3.

Los registros electrofisiológicos permitieron evaluar los cambios en la respuesta del receptor inducidos por los compuestos mediante mediciones de corriente en presencia de glicina. Se compararon los efectos de cada sulfonamida sobre la actividad de GlyR α 3 WT y de la mutante fosfomimética S346E, para así obtener información sobre su posible mecanismo de acción como potenciales moduladores alostéricos de GlyR α 3.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada compuesto, detallando su efecto en la corriente inducida por glicina y su capacidad moduladora sobre GlyR α 3 WT y S346E.

5.3.2 Caracterización electrofisiológica del receptor GlyR α 3 en presencia de glicina

Como paso inicial experimental en la evaluación de los derivados de sulfonamidas con anillos de THQ, se realizaron registros electrofisiológicos de célula completa en células HEK293 transfectadas, aplicando concentraciones crecientes de glicina (3 μ M - 1000 μ M) en solución extracelular (SEN), para confirmar diferencias funcionales entre GlyR α 3 WT y su mutante fosfomimética S346E (**Figura 17**).

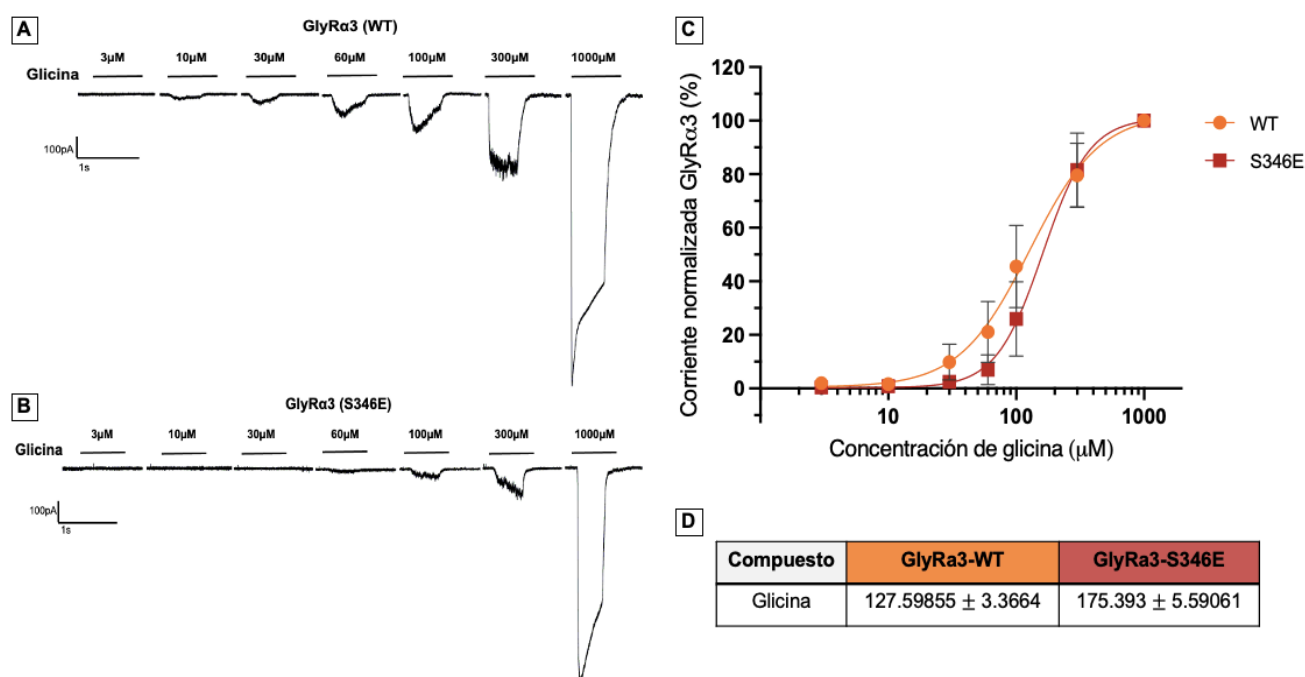


Figura 17. Curvas dosis-respuesta de GlyR α 3-WT y GlyR α 3-S346E en presencia de glicina. A) Registros electrofisiológicos representativos de las corrientes evocadas en células HEK293 que expresan GlyR α 3-WT a concentraciones crecientes de glicina. B) Registros de corriente en células HEK293 que expresan GlyR α 3-S346E bajo las

mismas condiciones experimentales. C) Curvas concentración-respuesta para glicina mostrando diferencias en la sensibilidad a glicina en GlyR α 3 WT (círculos naranjas) y mutante fosfomimético S346E (cuadrados rojos). Cada punto representa la media de la corriente normalizada (%), y las barras indican la desviación del error estándar (SED por sus siglas en inglés). (D) Valores de EC₅₀ obtenidos para GlyR α 3 WT y S346E. Se aplicó una prueba de t-student que resultó en un p-value de 6.21×10^{-9} , indicando que la diferencia es estadísticamente significativa.

Los trazos de corriente representativos muestran una activación progresiva del receptor en función de la concentración de glicina. Para GlyR α 3-WT (**Figura 17A**), se observó un aumento en la amplitud de la corriente a medida que la concentración del agonista se incrementaba. Un comportamiento similar se registró para GlyR α 3-S346E (**Figura 17B**), aunque con ligeras diferencias en la magnitud de las corrientes evocadas a bajas concentraciones, lo que sugiere una menor sensibilidad a la glicina en comparación con el WT.

Las curvas concentración-respuesta (**Figura 17C**) mostraron que la curva GlyR α 3-WT, incrementó su respuesta a partir de 10 μ M de glicina, alcanzando un EC₅₀ a $127.60 \pm 3.37 \mu$ M (**Figura 17D**). En cambio, para GlyR α 3-S346E la respuesta aumentó después de 30 μ M de glicina, con un EC₅₀ de $175.39 \pm 5.59 \mu$ M (**Figura 17D**), lo que indica que este estado requiere una mayor concentración de glicina para alcanzar niveles equivalentes de activación. Esta diferencia entre los valores de EC₅₀ fue significativa confirmando que la mutación fosfomimética S346E afecta la afinidad aparente del

receptor a la glicina. Este resultado concuerda con estudios previos que han descrito modificaciones en la afinidad del receptor debido a la fosforilación de la serina en la posición 346 (Han et al., 2013; Moraga-Cid et al., 2020).

Si bien la curva de S346E se desplaza hacia la derecha (**Figura 17C**), sugiriendo una disminución en la afinidad aparente a la glicina, los valores de EC_{50} (**Figura 17D**) muestran que la diferencia no es lo suficientemente marcada como para afectar la afinidad del receptor a la glicina. En cambio, la principal diferencia radica en la eficiencia de activación a concentraciones bajas e intermedias. A concentraciones $\geq 300 \mu\text{M}$ (**Figura 17C**), ambos receptores alcanzaron respuestas cercanas a su máximo, lo que sugiere que la mutante fosfomimética no afecta la activación máxima del receptor.

5.3.3 Análisis electrofisiológico preliminar de las sulfonamidas con anillos de THQ sintetizadas en GlyR α 3-WT

Para evaluar el efecto funcional de las sulfonamidas sintetizadas sobre el receptor GlyR α 3-WT, se realizaron registros electrofisiológicos de célula completa en células HEK293. Se evaluó la respuesta del receptor en presencia de concentraciones crecientes de las sulfonamidas SAM-1, JL-01, JL-02 y CO2-1, manteniendo una concentración constante de glicina ($50 \mu\text{M}$) como agonista principal. Para cada compuesto, se realizaron mediciones a tres concentraciones ($1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$),

excepto de CO2-1, cuya solubilidad limitó la evaluación, por lo que se ajustaron las concentraciones a 1 μ M, 10 μ M y 30 μ M (**Figura 18**).

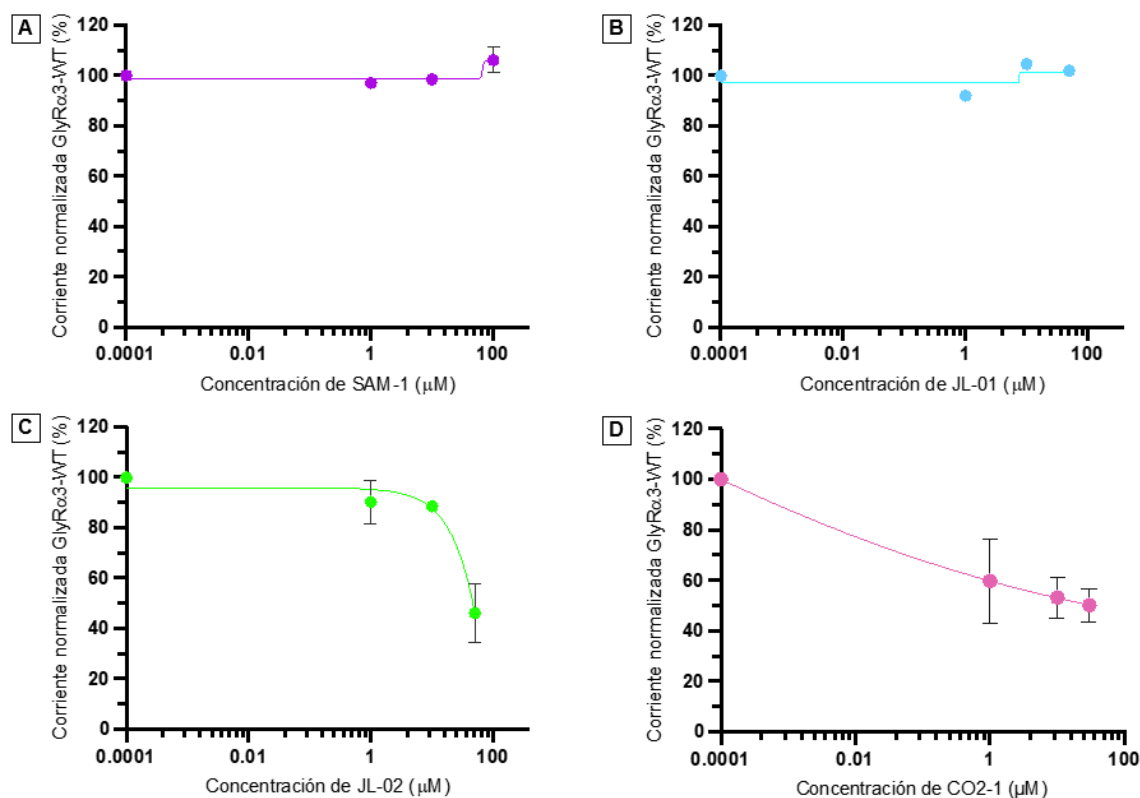


Figura 18. Evaluación funcional preliminar de las sulfonamidas sintetizadas en GlyRα3-WT. Curvas de concentración-respuesta de A) SAM-1, B) JL-01, C) JL-02, y D) CO2-1.

Los resultados obtenidos muestran que SAM-1 (**Figura 18A**) y JL-01 (**Figura 18B**) no generaron cambios en la respuesta del receptor, manteniendo la corriente normalizada

en torno al 100 % en todas las concentraciones evaluadas. Esto concuerda con los estudios computacionales previos, ya que SAM-1 es un precursor estructural sin modificaciones relevantes para la modulación del receptor, mientras que JL-01, según los resultados *in silico*, presentaba una energía libre de unión desfavorable, lo que sugería una baja estabilidad en el sitio alostérico y, por ende, la ausencia de efecto modulador.

Por otro lado, JL-02 (**Figura 18C**) mostró una disminución progresiva de la corriente normalizada en función de la concentración en GlyR α 3-WT, mientras que CO2-1, por su parte, también redujo la respuesta a glicina (**Figura 18D**), aunque con un perfil diferente al de JL-02. Si bien ambos compuestos habían sido identificados como candidatos con buena estabilidad en el sitio alostérico (**Tabla 3**), su rol como MAPs podría estar influenciado por la concentración basal de glicina utilizada en los experimentos, lo que sugiere que su actividad podría variar en función del contexto fisiológico, manifestandose de manera diferente en presencia de niveles más altos o más bajos de glicina. Dado que estos resultados corresponden únicamente a GlyR α 3-WT, es necesario evaluar su efecto en la mutante fosfomimética S346E, para determinar si presentan un comportamiento diferente en el receptor fosforilado. Esto es clave, ya que el diseño de estas moléculas tiene como objetivo modular específicamente el estado fosforilado del receptor.

Estos resultados permitieron identificar a JL-02 y CO2-1 como sulfonamidas con actividad moduladora sobre GlyR α 3-WT, reforzando el valor del diseño racional en la

selección de candidatos. No obstante, para comprender mejor su mecanismo de acción, es fundamental analizar su efecto en GlyR α 3-S346E.

5.3.4 Evaluación electrofisiológica de JL-02 en GlyR α 3 WT y S346E

Para profundizar en el efecto de JL-02 sobre la actividad de GlyR α 3, se realizaron registros electrofisiológicos de célula completa en células HEK293 transfectadas con GlyR α 3 WT y su mutante fosfomimética S346E. Se aplicaron concentraciones crecientes de JL-02 (0.1 a 50 μ M) en presencia de 50 μ M de glicina para evaluar diferencias en su modulación entre ambos estados de GlyR α 3 (**Figura 19**).

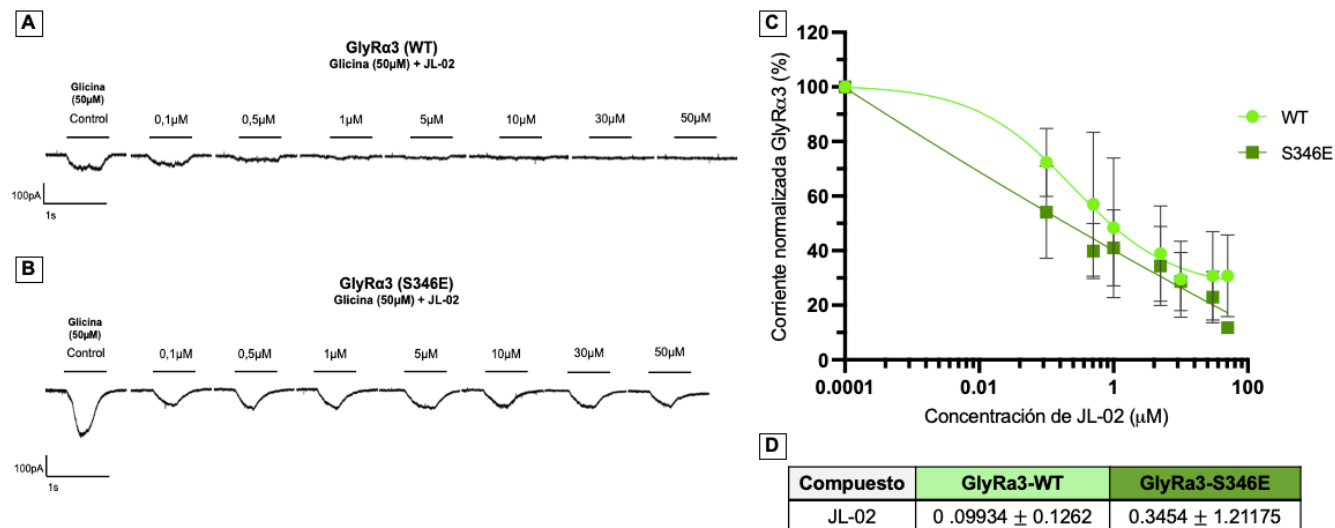


Figura 19. Evaluación electrofisiológica de JL-02 en GlyR α 3-WT y S346E.

Registros electrofisiológicos de célula completa en células HEK293 transfectadas con GlyR α 3 WT (A) y su mutante fosfomimética S346E (B) en presencia de glicina (50 μ M)

y concentraciones crecientes de JL-02 (0.1 – 50 μ M). C) Curva concentración-respuesta de JL-02 para GlyR α 3 WT (verde claro) y S346E (verde oscuro). Cada punto representa la media de la corriente normalizada (%), y las barras indican la desviación del error estándar (SED por sus siglas en inglés). D) Valores de IC₅₀, obtenidos para GlyR α 3 WT y S346E.

Los registros representativos obtenidos para GlyR α 3-WT (**Figura 19A**) muestran que la adición de JL-02 generó una disminución progresiva en la amplitud de las corrientes evocadas por glicina, evidenciando un efecto inhibitorio concentración-dependiente. La reducción de la respuesta se observa desde las concentraciones más bajas (0.1 μ M), lo que indica una alta sensibilidad del receptor WT a la modulación por JL-02.

En GlyR α 3-S346E, la respuesta general al compuesto tiene un perfil similar en términos de reducción de la amplitud de las corrientes inducidas por glicina (**Figura 19B**). Sin embargo, la magnitud de la inhibición es menor en comparación con GlyR α 3-WT, lo que sugiere una alteración en la sensibilidad del receptor mutante al compuesto.

El análisis de las curvas concentración-respuesta (**Figura 19C**) reveló diferencias en la afinidad aparente de cada receptor al compuesto JL-02. En GlyR α 3-WT, la respuesta a JL-02 sigue una tendencia concentración-dependiente con una inhibición más pronunciada, mientras que en GlyR α 3-S346E se observa un desplazamiento de la curva hacia la derecha, indicando una reducción en la sensibilidad del receptor mutante al compuesto. Los valores de IC₅₀ obtenidos para JL-02 (**Figura 19D**) reflejan

esta diferencia, con GlyR α 3-WT mostrando una mayor afinidad aparente, ($EC_{50} = 0.09934 \pm 0.1262 \mu\text{M}$) en comparación con GlyR α 3-S346E ($EC_{50} = 0.3454 \pm 1.21175 \mu\text{M}$).

Estos resultados sugieren que JL-02 actúa como un modulador alostérico negativo de GlyR α 3, reduciendo la corriente inducida por glicina de manera concentración-dependiente. Además, la diferencia en la sensibilidad entre GlyR α 3 WT y S346E indica que la fosforilación en la posición 346 puede influir en la interacción del compuesto con el receptor, disminuyendo su eficacia moduladora.

Dado que el diseño de estas sulfonamidas se basó en la identificación de compuestos con alta estabilidad en el sitio alostérico, este comportamiento sugiere que su mecanismo de acción podría depender de evaluar su impacto en presencia de diferentes concentraciones de glicina y de compuesto.

5.3.5 Evaluación electrofisiológica de CO2-1 en GlyR α 3-WT y GlyR α 3-S346E

Para evaluar con mayor profundidad el efecto funcional de CO2-1 sobre GlyR α 3, se realizaron registros electrofisiológicos de célula completa en células HEK293 transfectadas con GlyR α 3-WT y su mutante S346E. Se aplicaron concentraciones crecientes de CO2-1 (0.01 - 30 μM) en presencia de 50 μM de glicina para evaluar su modulación en cada estado del receptor (**Figura 20**).

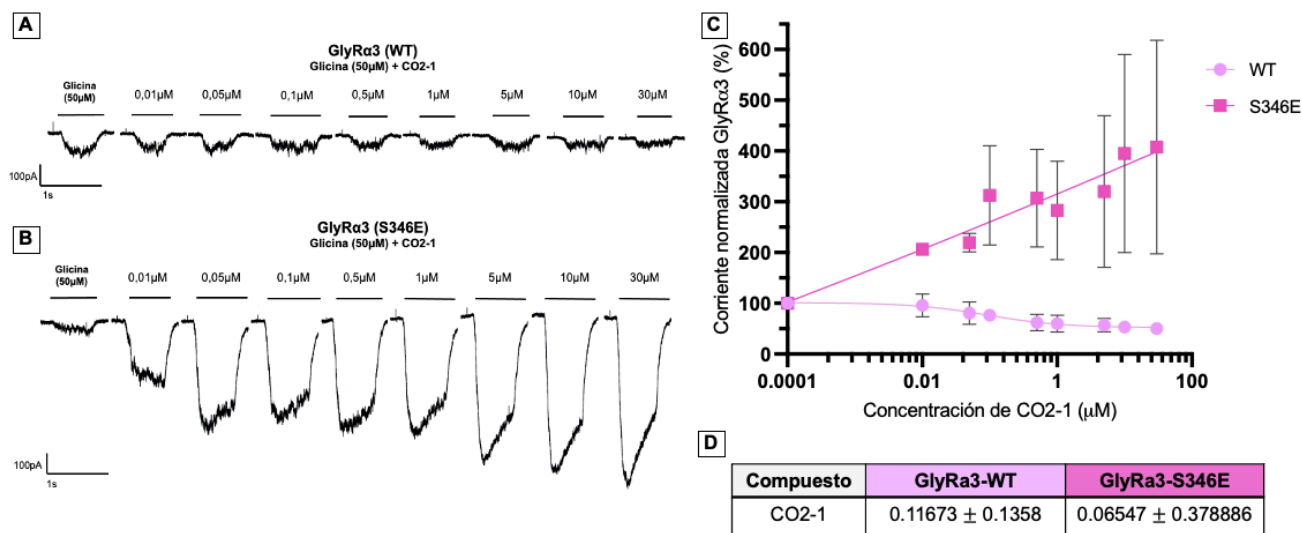


Figura 20. Evaluación electrofisiológica de CO2-1 en GlyRa3 WT y S346E. A) Registros de corriente en células HEK293 expresando GlyRa3-WT (A) y su mutante fosfomimética S346E (B) en presencia de glicina (50 μM) y concentraciones crecientes de CO2-1 (0.01 – 30 μM). C) Curva concentración-respuesta de CO2-1 para GlyRa3 WT (rosado) y S346E (magenta). Cada punto representa la media de la corriente normalizada (%), y las barras indican la desviación del error estándar (SED por sus siglas en inglés). D) Valores de IC₅₀ obtenidos para GlyRa3-WT y de EC₅₀ para GlyRa3-S346E.

Los registros representativos obtenidos para GlyRa3-WT (**Figura 20A**) mostraron que la adición de CO2-1 generó una disminución progresiva en la amplitud de las corrientes evocadas por glicina, indicando un efecto inhibitorio concentración-dependiente. La reducción de la respuesta se observó desde las concentraciones más bajas evaluadas

(0.01 μM), sugiriendo que GlyR α 3-WT es altamente sensible a la modulación por este compuesto.

En contraste, en GlyR α 3-S346E, la aplicación resultó en un incremento progresivo en la amplitud de las corrientes inducidas por glicina (**Figura 20B**), indicando un efecto potenciador en este estado del receptor. Esta respuesta contraria a la observada en el WT sugiere que la fosfomimetización en S346 modifica la interacción de CO2-1 con el receptor, cambiando su efecto de inhibición a potenciación. El análisis de las curvas concentración-respuesta (**Figura 20C**) mostró que mientras GlyR α 3-WT presentó una inhibición progresiva, en GlyR α 3-S346E, exhibió una tendencia contraria con un aumento gradual en la corriente normalizada al aumentar la concentración del compuesto. Para el compuesto CO2-1 se obtuvieron valores de IC_{50} en GlyR α 3-WT de $0.11673 \pm 0.1358 \mu\text{M}$, mientras que para GlyR α 3-S346E valores de EC_{50} de $0.06547 \pm 0.378886 \mu\text{M}$ (**Figura 20D**).

Estos resultados sugieren que CO2-1 actúa como un modulador alostérico de GlyR α 3 con un efecto bidireccional dependiente del estado conformacional del receptor. La inhibición observada en GlyR α 3-WT sugiere que en su estado basal, CO2-1 podría estabilizar una conformación menos activa del receptor. Sin embargo, en GlyR α 3-S346E, su efecto potenciador indica que la fosforilación en S346 altera la interacción con el sitio alostérico, favoreciendo una modulación positiva.

Este comportamiento sugiere que CO2-1 podría actuar de manera estado-dependiente, funcionando como un inhibidor en la conformación WT y como un MAP

para la mutante fosfomimética. Estos hallazgos refuerzan la importancia de la modulación conformacional en el diseño de nuevos compuestos dirigidos a GlyR α 3, y destacan la necesidad de evaluar su efecto en un contexto fisiológico más amplio para determinar su potencial como modulador terapéutico.

6 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen al desarrollo y caracterización de derivados de sulfonamidas con anillos de THQ como potenciales MAPs de GlyR α 3, particularmente en su estado fosforilado, lo cual es bastante relevante debido al papel clave que desempeña esta modificación postraducciona en estados patológicos como el dolor crónico, donde la desinhibición glicinérgica está implicada (Acuña et al., 2016; San Martín et al., 2022; Zeilhofer et al., 2021).

La comparación estructural realizada entre GlyR α 1 y GlyR α 3 tuvo como propósito explorar si existían diferencias en la geometría del sitio de unión alostérico de AM-3607 que pudieran favorecer la selectividad específica hacia GlyR α 3, aspecto que no había sido claramente definido en estudios anteriores (Bregman et al., 2017; Huang et al., 2016). Los resultados obtenidos evidenciaron que aunque el sitio de unión alostérico está altamente conservado a nivel de secuencia, se observaron diferencias geométricas en la posición espacial de ciertos residuos clave, particularmente en los residuos de la cadena B, donde se observaron valores de RMSD superiores a 2.5 Å (**Figura 9**). Estas variaciones espaciales podrían modular la respuesta de GlyR α 3 frente a ligandos específicos, coincidiendo con el reciente estudio de Lara et al., (2025), el cuál validó de forma experimental que ligandos específicos como AM-1488 conducen a una modulación diferencial entre las subunidades α 1 y α 3, lo cual se relaciona con los resultados obtenidos y soporta el enfoque estructural que se adoptó.

Mediante diseño computacional se construyó una quimioteca estructuralmente diversa y optimizada de derivados de sulfonamidas con anillos de THQ. Aunque inicialmente se seleccionaron moléculas con mejores perfiles energéticos (ΔG_{Bind}) que el ligando de referencia AM-3607, se priorizó la evaluación computacional y experimental de los compuestos JL-02 y CO2-1 debido a consideraciones prácticas como su mayor viabilidad sintética y disponibilidad inmediata, facilitando así una validación experimental eficiente y directa. Las simulaciones de dinámica molecular confirmaron que ambos compuestos se estabilizaron eficazmente en el sitio alostérico de GlyR α 3 (**Figura 15**), manteniendo interacciones clave con residuos esenciales previamente descritos para moduladores alostéricos tricíclicos como AM-3607 y AM-1488, especialmente mediante enlaces de hidrógeno con R29 e interacciones pi-pi con F32, Y78 y Y161 (Lara et al., 2025; Bregman et al., 2017). Además, el análisis de las interacciones por fragmentos reveló que los anillos de THQ (F1) fueron cruciales en la estabilización hidrofóbica del complejo receptor-ligando, aportando información novedosa y complementaria sobre cómo las modificaciones en esta región pueden ser estratégicas para mejorar aún más la especificidad y eficacia funcional. Mientras que los fragmentos que abarcaban el grupo sulfonamida (F2) y el anillo aromático (F3) contribuyeron con enlaces hidrógeno y contactos pi-pi esenciales.

Los resultados funcionales obtenidos mediante electrofisiología permitieron validar de forma parcial el diseño computacional propuesto en este estudio. Las curvas concentración-respuesta para glicina en GlyR α 3-WT y GlyR α 3-S346E mostraron valores de EC_{50} de $127.599 \pm 3,366 \mu\text{M}$ y $175.393 \pm 5.591 \mu\text{M}$, respectivamente. Estos

valores reflejan un leve desplazamiento en la curva concentración-respuesta en la mutante fosfomimética, lo que sugiere una menor afinidad aparente a glicina, probablemente debido a cambios conformacionales inducidos por la fosforilación en la posición 346, consistentes con hallazgos sobre la modulación de GlyR α 3 a causa de modificaciones postraduccionales como la fosforilación (Lara et al., 2025; Moraga-Cid et al., 2020). Cabe destacar que se utilizó glicina a 50 μ M como concentración de referencia para establecer la respuesta basal del receptor y evaluar los efectos moduladores de los compuestos.

En cuanto a la modulación alostérica inducida por las sulfonamidas diseñadas, el compuesto JL-02 mostró valores de EC₅₀ de 0.099 ± 0.126 μ M en GlyR α 3-WT y 0.345 ± 1.212 μ M en GlyR α 3-S346E. Por su parte, CO2-1 presentó valores de 0.117 ± 0.136 μ M en GlyR α 3-WT y 0.066 ± 0.379 μ M en GlyR α 3-S346E. Estos valores son más bajos en comparación con sulfonamidas reportadas, como AM-1488 (EC₅₀ = 0.454 ± 0.067 μ M) (Bregman et al., 2017), aunque ligeramente superiores a la afinidad de la molécula de referencia AM-3607 en GlyR α 3-WT (EC₅₀ = 0.050 ± 0.012 μ M) (Bregman et al., 2017). Estos resultados destacan la capacidad que tienen estos compuestos de modular de forma alostérica a GlyR α 3.

A pesar de que las sulfonamidas diseñadas no se comportaron exclusivamente como MAPs, JL-02 ejerció un efecto inhibitorio sobre las corrientes evocadas por glicina tanto en GlyR α 3-WT como en GlyR α 3-S346E, aunque la inhibición fue menor en el receptor fosfomimético. Por otra parte, se manifestó un comportamiento interesante por parte

de CO2-1, que mostró un perfil dual: actuó como inhibidor en GlyR α 3-WT y como potenciador en GlyR α 3-S346, además de hacerlo a bajas concentraciones del compuesto. Esta molécula presenta un perfil funcional novedoso y de gran relevancia al mostrar una modulación diferencial dependiente del estado del receptor (WT vs. fosfomimético). La fosforilación de GlyR α 3 podría inducir un estado conformacional particular que condiciona la respuesta diferencial con CO2-1, lo cual valida la hipótesis de que este compuesto puede revertir la inhibición inducida por la fosforilación en S346. A diferencia de los moduladores previamente estudiados, como AM-3607 o AM-1488 (Bregman et al., 2017; Huang et al., 2015), esta modulación podría ofrecer una ventaja terapéutica significativa para tratar el dolor crónico, ya que considera el estado fosforilado del receptor.

Aunque este estudio aporta una aproximación integral, aún es necesario explorar con otras concentraciones del compuesto y estos compuestos frente a otros subtipos de GlyRs y miembros de la familia pLGICs, así como evaluar su eficacia, farmacocinética y seguridad. Además las desviaciones observadas, particularmente en algunas respuestas funcionales, podrían reducirse mediante un mayor número de réplicas experimentales en futuras fases de este proyecto, lo cual permitiría fortalecer la solidez estadística de los resultados obtenidos. Asimismo, se propone continuar con la evaluación funcional de los compuestos que, en la etapa de diseño computacional, presentaron mejores perfiles energéticos, retomando la hipótesis inicial del proyecto. Estos resultados no solo validan el diseño estructural y computacional planteado inicialmente, sino que proporcionan evidencia para respaldar el futuro desarrollo de sulfonamidas con anillos de THQ como moduladores específicos del estado fosforilado

de GlyR α 3, ofreciendo alternativas terapéuticas novedosas y prometedoras para el tratamiento del dolor crónico.

7 CONCLUSIONES

Este estudio validó el potencial de las sulfonamidas con anillos de THQ como MAPs de GlyR α 3 fosforilado, una condición clave en la desinhibición glicinérgica asociada al dolor crónico.

El análisis estructural de GlyR α 1 y GlyR α 3 permitió identificar diferencias geométricas en residuos clave del sitio alostérico, particularmente en la cadena B, con valores de RMSD superiores a 2.5 Å. Estas variaciones estructurales justifican el diseño de compuestos para GlyR α 3.

La integración de diseño computacional, simulaciones de dinámica molecular y registros electrofisiológicos, confirmó que uno de los compuestos diseñados (CO2-1) puede revertir la inhibición funcional inducida por la fosforilación mediada por PKA. Los compuestos JL-02 y CO2-1 mostraron perfiles de interacción estables con el sitio unión de GlyR α 3, capaces de modular alostéricamente el receptor. Cabe destacar que solamente CO2-1 tuvo la capacidad de potenciar las corrientes glicinérgicas en GlyR α 3 S346E, consolidando como un candidato prometedor para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas al tratamiento del dolor crónico. Esta sulfonamida con anillos de THQ presenta ventajas significativas frente a otros moduladores alostéricos previamente descritos, por su especificidad por GlyR α 3 fosforilado y su estabilidad al interactuar

con el receptor. Estas características la posicionan como una novedosa alternativa terapéutica altamente viable y representa un avance en el desarrollo de estrategias farmacológicas más dirigidas. No obstante, es fundamental continuar con la evaluación electrofisiológica de estos compuestos para determinar con certeza su eficacia y comportamiento en sistemas biológicos. Asimismo, se propone evaluar funcionalmente los demás compuestos de la quimioteca que presentaron mejor energía de unión durante la etapa *in silico*, lo cual permitirá consolidar la hipótesis inicial del proyecto y expandir la búsqueda de moduladores efectivos del estado fosforilado de GlyR α 3.

8 BIBLIOGRAFÍA

Acuña, M. A., Yévenes, G. E., Ralvenius, W. T., Benke, D., Di Lio, A., Lara, C. O., Muñoz, B., Burgos, C. F., Moraga-Cid, G., Corringier, P. J., & Zeilhofer, H. U. (2016). Phosphorylation state-dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(7), 2547. <https://doi.org/10.1172/JCI83817>

Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W. L., & Zeilhofer, H. U. (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nature Neuroscience*, 5(1), 34–40. <https://doi.org/10.1038/NN778>

Alorfi, N. M. (2023). Pharmacological Methods of Pain Management: Narrative Review of Medication Used. *International Journal of General Medicine*, 16, 3247–3256. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S419239>

Baer, K., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., & Rees, M. I. (2011). Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: An immunohistochemical review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2(NOV), 947. <https://doi.org/10.3389/NEURO.02.025.2009/BIBTEX>

Bolhuis, P. G. (2006). Sampling Kinetic Protein Folding Pathways using All-Atom Models. *Lecture Notes in Physics*, 703, 393–433. https://doi.org/10.1007/3-540-35273-2_11

Bregman, H., Simard, J. R., Andrews, K. L., Ayube, S., Chen, H., Gunaydin, H., Guzman-Perez, A., Hu, J., Huang, L., Huang, X., Krolikowski, P. H., Lehto, S. G., Lewis, R. T., Michelsen, K., Pegman, P., Plant, M. H., Shaffer, P. L., Teffera, Y., Yi, S., ... DiMauro, E. F. (2017). The Discovery and Hit-to-Lead Optimization of Tricyclic Sulfonamides as Potent and Efficacious Potentiators of Glycine Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(3), 1105–1125. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.6B01496/SUPPL_FILE/JM6B01496_SI_002.CSV

Breitinger, U., & Breitinger, H. G. (2020). Modulators of the Inhibitory Glycine Receptor. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(12), 1706–1725. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.0C00054>

Brejč, K., Van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., Van Der Oost, J., Smit, A. B., & Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-

binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 411(6835), 269–276. <https://doi.org/10.1038/35077011>

Cerdan, A. H., Sisquellas, M., Pereira, G., Barreto Gomes, D. E., Changeux, J.-P., & Cecchini, M. (2020). The Glycine Receptor Allosteric Ligands Library (GRALL). *Bioinformatics*, 36(11), 3379–3384. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa170>

Du, J., Lü, W., Wu, S., Cheng, Y., & Gouaux, E. (2015). Glycine receptor mechanism illuminated by electron cryo-microscopy. *Nature*, 526(7572), 224. <https://doi.org/10.1038/NATURE14853>

Dutertre, S., Becker, C. M., & Betz, H. (2012). Inhibitory glycine receptors: An update. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 287, Issue 48). <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.408229>

Fine, P. G. (2011). Long-Term Consequences of Chronic Pain: Mounting Evidence for Pain as a Neurological Disease and Parallels with Other Chronic Disease States. *Pain Medicine*, 12(7), 996–1004. https://doi.org/10.1111/J.1526-4637.2011.01187.X/2/PME_1187_F1.JPEG

Gallagher, C. I., Ha, D. A., Harvey, R. J., & Vandenberg, R. J. (2022). Positive Allosteric Modulators of Glycine Receptors and Their Potential Use in Pain Therapies. *Pharmacological Reviews*, 74(4), 933. <https://doi.org/10.1124/PHARMREV.122.000583>

Germann, A. L., Shin, D. J., Manion, B. D., Edge, C. J., Smith, E. H., Franks, N. P., Evers, A. S., & Akk, G. (2016). Activation and modulation of recombinant glycine and GABAA receptors by 4-halogenated analogues of propofol. *British Journal of Pharmacology*, 173(21), 3110. <https://doi.org/10.1111/BPH.13566>

Gibbs, E., Klemm, E., Seiferth, D., Kumar, A., Ilca, S. L., Biggin, P. C., & Chakrapani, S. (2023). Conformational transitions and allosteric modulation in a heteromeric glycine receptor. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37106-7>

Goldberg, D. S., & McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11, 770. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-770>

Groeneweg, F. L., Trattnig, C., Kuhse, J., Nawrotzki, R. A., & Kirsch, J. (2018). Gephyrin: a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond. *Histochemistry and Cell Biology*, 150(5), 489–508. <https://doi.org/10.1007/S00418-018-1725-2/FIGURES/4>

Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H., & Laube, B. (2005). The β subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*, 45(5), 727–739. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.028>

Han, L., Talwar, S., Wang, Q., Shan, Q., & Lynch, J. W. (2013). Phosphorylation of $\alpha 3$ Glycine Receptors Induces a Conformational Change in the Glycine-Binding Site. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(10), 1361. <https://doi.org/10.1021/CN400097J>

Harvey, R. J., Depner, U. B., Wässle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O. M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D. P., Betz, H., Zeilhofer, H. U., & Müller, U. (2004). GlyR $\alpha 3$: An Essential Target for Spinal PGE2-Mediated Inflammatory Pain Sensitization. *Science*, 304(5672), 884–887. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1094925/SUPPL_FILE/HARVEY.SOM.PDF

Harvey, V. L., Caley, A., Müller, U. C., Harvey, R. J., & Dickenson, A. H. (2011). A selective role for $\alpha 3$ subunit glycine receptors in inflammatory pain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2(NOV), 890. <https://doi.org/10.3389/NEURO.02.014.2009/BIBTEX>

Huang, X., Chen, H., Michelsen, K., Schneider, S., & Shaffer, P. L. (2015). Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$ bound to antagonist strychnine. *Nature*, 526, 277–280. <https://doi.org/10.1038/nature14972>

Huang, X., Shaffer, P. L., Ayube, S., Bregman, H., Chen, H., Lehto, S. G., Luther, J. A., Matson, D. J., McDonough, S. I., Michelsen, K., Plant, M. H., Schneider, S., Simard, J. R., Teffera, Y., Yi, S., Zhang, M., Dimauro, E. F., & Gingras, J. (2016). Crystal structures of human glycine receptor $\alpha 3$ bound to a novel class of analgesic potentiators. *Nature Structural & Molecular Biology* 2016 24:2, 24(2), 108–113. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3329>

Imlach, W. L. (2017). New approaches to target glycinergic neurotransmission for the treatment of chronic pain. *Pharmacological Research*, 116, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.019>

Karan Kumar, B., Venkata Gowri Chandra Sekhar, K., Chander, S., Kunjiappan, S., & Murugesan, S. (2021). *Medicinal chemistry perspectives of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline analogs-biological activities and SAR studies*. <https://doi.org/10.1039/d1ra01480c>

Kasaragod, V. B., & Schindelin, H. (2018). Structure–Function Relationships of Glycine and GABAA Receptors and Their Interplay With the Scaffolding Protein Gephyrin. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 390575. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00317/BIBTEX>

Lara, C. O., Burgos, C. F., Fariña-Oliva, K., Marileo, A. M., Martín, V. P. S., Flaig, D., Soto-Ortega, P., Contreras, O. V., Sazo, A., Gaete-Riquelme, K., Corradi, J., Muñoz-Montesino, C., Fuentealba, J., Castro, P. A., Aguayo, L. G., Bouzat, C., Moraga-Cid, G., & Yévenes, G. E. (2025). Allosteric modulation and direct activation of glycine receptors by a tricyclic sulfonamide. *Scientific Reports* 2025 15:1, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90209-7>

Lawrence, A., Kaul, A., & Seaver, M. (2023). Chronic Pain. *The 5-Minute Clinical Consult Standard* 2016: Twenty Fourth Edition. <https://doi.org/10.1542/9781581109689-part01-ch40>

Lobo, I. A., & Harris, R. A. (2005). Sites of Alcohol and Volatile Anesthetic Action on Glycine Receptors. *International Review of Neurobiology*, 65, 53–87. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(04\)65003-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(04)65003-3)

Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2012). OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic acids research*, 40(D1), D370-D376

Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological Reviews*, 84(4), 1051–1095. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00042.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0040403220006.JPEG>

Lynch, J. W. (2009). Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, 56(1), 303–309. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.07.034>

Maynard, S. A., Rostaing, P., Schaefer, N., Gemin, O., Candat, A., Dumoulin, A., Villmann, C., Triller, A., & Specht, C. G. (2021). Identification of a stereotypic molecular arrangement of endogenous glycine receptors at spinal cord synapses. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.74441>

Mills, S. E. E., Nicolson, K. P., & Smith, B. H. (2019). Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 123(2), e273. <https://doi.org/10.1016/J.BJA.2019.03.023>

Molchanova, S. M., Comhair, J., Karadurmus, D., Piccart, E., Harvey, R. J., Rigo, J. M., Schiffmann, S. N., Brône, B., & Gall, D. (2018). Tonically active $\alpha 2$ subunit-containing glycine receptors regulate the excitability of striatal medium spiny neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 316936. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00442/BIBTEX>

Moraga-Cid, G., San Martín, V. P., Lara, C. O., Muñoz, B., Marileo, A. M., Sazo, A., Muñoz-Montesino, C., Fuentealba, J., Castro, P. A., Guzmán, L., Burgos, C. F., Zeilhofer, H. U., Aguayo, L. G., Corringer, P.-J., & Yévenes, G. E. (2020). Modulation

of glycine receptor single-channel conductance by intracellular phosphorylation. *Scientific Reports*, 10, 40804. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61677-w>

Mujumdar, P., & Poulsen, S. A. (2015). Natural Product Primary Sulfonamides and Primary Sulfamates. *Journal of Natural Products*, 78(6), 1470–1477. <https://doi.org/10.1021/NP501015M>

Murakami, T., Araki, T., Yamano, M., Wanaka, A., Betz, H., & Tohyama, M. (1988). Localization of the glycine receptors in the rat central nervous system: an immunocytochemical analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 236, 71–80. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5971-6_6/COVER

Muthukrishnan, I., Sridharan, V., & Menéndez, J. C. (2019). Progress in the Chemistry of Tetrahydroquinolines. *Chemical Reviews*, 119(8), 5057–5191. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.8B00567>

Nieto, F. R., Vuckovic, S. M., & Prostran, M. S. (2020). Editorial: Mechanisms and New Targets for the Treatment of Chronic Pain. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 600037. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.600037/BIBTEX>

Prevost, M. S., Moraga-Cid, G., Van Renterghem, C., Edelstein, S. J., Changeux, J. P., & Corringer, P. J. (2013). Intermediate closed state for glycine receptor function revealed by cysteine cross-linking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), 17113–17118. https://doi.org/10.1073/PNAS.1317009110/SUPPL_FILE/PNAS.201317009SI.PDF

Quintana, S. (2023). *Modulación del receptor alfa-3 de glicina por alopregnanolona*. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/8796566?show=full>

Raffaelli, W., & Arnaudo, E. (2017). Pain as a disease: an overview. *Journal of Pain Research*, 10, 2003. <https://doi.org/10.2147/JPR.S138864>

San Martín, V. P., Burgos, C. F., Marileo, A. M., Lara, C. O., Sazo, A., Fuentealba, J., Guzmán, L., Castro, P. A., Aguayo, L. G., Moraga-Cid, G., & Yévenes, G. E. (2019). Inhibitory actions of tropeines on the $\alpha 3$ glycine receptor function. *Frontiers in Pharmacology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00331/FULL>

San Martín, V. P., Sazo, A., Utreras, E., Moraga-Cid, G., & Yévenes, G. E. (2022). Glycine Receptor Subtypes and Their Roles in Nociception and Chronic Pain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.848642>

Sievers, F., Barton, G. J., & Higgins, D. G. (2020). Multiple Sequence Alignment. *Bioinformatics*, 227, 227–250

Shan, Q., Haddrill, J. L., & Lynch, J. W. (2001). *Ivermectin, an Unconventional Agonist of the Glycine Receptor Chloride Channel**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011264200>

Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B. H., ... Wang, S. J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, 156(6), 1003. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000000160>

Tyagarajan, S. K., & Fritschy, J. M. (2014). Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nature Reviews Neuroscience* 2014 15:3, 15(3), 141–156. <https://doi.org/10.1038/nrn3670>

Varrassi, G., Müller-Schwefe, G., Pergolizzi, J., Ornska, A., Morlion, B., Mavrocordatos, P., Margarit, C., Mangas, C., Jaksch, W., Huygen, F., Collett, B., Berti, M., Aldington, D., & Ahlbeck, K. (2010). Pharmacological treatment of chronic pain – the need for CHANGE. *Current Medical Research and Opinion*, 26(5), 1231–1245. <https://doi.org/10.1185/03007991003689175>

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191.

Werynska, K., Gingras, J., Benke, D., Scheurer, L., Neumann, E., & Zeilhofer, H. U. (2021). A Glra3 phosphodeficient mouse mutant establishes the critical role of protein kinase A-dependent phosphorylation and inhibition of glycine receptors in spinal inflammatory hyperalgesia. *Pain*, 162(9), 2436. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002236>

Xiong, W., Cui, T., Cheng, K., Yang, F., Chen, S. R., Willenbring, D., Guan, Y., Pan, H. L., Ren, K., Xu, Y., & Zhang, L. (2012). Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1121–1134. <https://doi.org/10.1084/JEM.20120242>

Yevenes, G. E., & Zeilhofer, H. U. (2011). Allosteric modulation of glycine receptors. *British Journal of Pharmacology*, 164(2), 224. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01471.X>

Yévenes, G. E., & Zeilhofer, H. U. (2011). Molecular Sites for the Positive Allosteric Modulation of Glycine Receptors by Endocannabinoids. *PLOS ONE*, 6(8), e23886. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023886>

Zeilhofer, H. U., Acuña, M. A., Gingras, J., Gonzalo, ·, & Yévenes, E. (2018). Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 447–465. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2622-x>

Zeilhofer, H. U., Werynska, K., Gingras, J., & Yévenes, G. E. (2021). Glycine Receptors in Spinal Nociceptive Control—An Update. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 846, 11(6), 846. <https://doi.org/10.3390/BIOM11060846>

Zhu, H., & Gouaux, E. (2021). Architecture and assembly mechanism of native glycine receptors. *Nature*, 599(7885), 513–517. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04022-z>

Zimmer, Z., Fraser, K., Grol-Prokopczyk, H., & Zajacova, A. (2022). A global study of pain prevalence across 52 countries: examining the role of country-level contextual factors. *Pain*, 163(9), 1740–1750. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000002557>