



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE LA DOPAMINA COMO MODULADORES DE LOS RECEPTORES GABA_A

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

ALFREDO ALANIZ PALACIOS

DIRECTOR DE TESIS

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
Instituto de Neurobiología

COMITÉ TUTOR

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
Instituto de Neurobiología

DR. ESTUARDO LÓPEZ VERA

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

Querétaro, Querétaro, Febrero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN.

La identificación, el diseño y la optimización de moléculas con capacidad para modular las respuestas de los receptores ionotrópicos de GABA ($GABA_A$), ha permitido el desarrollo de tratamientos farmacológicos para trastornos del sistema nervioso central (SNC), tales como la ansiedad, el insomnio y la epilepsia, entre otros; adicionalmente, mediante dichos compuestos se ha logrado la identificación y caracterización de algunas de las 19 subunidades que conforman a esta familia.

La subunidad $\rho 1$, es una de las subunidades que fueron identificadas mediante el uso de moduladores; sus descripciones iniciales hacían referencia a un receptor a GABA el cual era insensible a la bicuculina y a su vez activado por el ácido *cis*-aminocrotónico (CACA); sin embargo, tuvieron que transcurrir casi dos décadas para que se lograra la plena identificación de este receptor, mediante la descripción de algunas de sus propiedades biofísicas tales como su baja o casi nula tasa de desensibilización, así como su particular perfil farmacológico; como que el principal agonista de los receptores metabotrópicos de GABA ($GABA_B$), el baclofeno no tiene efecto en esta subunidad. El ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il) metilfosfínico (TPMPA) fue el primer antagonista específico; si bien se han descrito una cantidad considerable de moduladores, en la actualidad se continúa la búsqueda de nuevas entidades moleculares; este interés es en gran parte debido a las nuevas funciones fisiológicas asociadas a este receptor.

Existen también moléculas de origen endógeno que modifican las respuestas del receptor a GABA, tales como la taurina, la serotonina (5-HT) y la dopamina (DA). Basados en la modulación negativa de la DA sobre el receptor $GABA_{A-\rho 1}$, en el presente trabajo se describen los efectos de los metabolitos de la vía dopaminérgica sobre dicho

receptor, de los cuales la 3-metoxitiramina (3-MT) es el antagonista más potente ($IC_{50}=259 \mu M$), mientras que los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y homovanílico (HVA) fueron al menos 6 veces menos potentes. Al considerarlos como análogos estructurales de la DA e incluir en la investigación a otras moléculas de la vía dopaminérgica (las cuales no modificaron las respuestas del receptor) permitió establecer la funcionalidad e impacto de las diferentes regiones de las moléculas en su efecto sobre los receptores $GABA_{A-\rho 1}$ expresado de manera heteróloga en ovocitos de *X. laevis*.

Los ensayos de competencia con GABA, sugirieron que los metabolitos comparten el sitio de unión; sin embargo y de manera complementaria el protocolo de comparación de mecanismos de acción muestra que hay al menos dos mecanismos distintos y excluyentes para los metabolitos; dichos mecanismos están determinados por la presencia del grupo amina y/o el ácido en los antagonistas. Finalmente, los ensayos de acoplamiento virtual (Molecular Docking), muestran las posibles orientaciones de los metabolitos dentro del sitio ortostérico, lo que, en conjunto con el resto de los experimentos, ha permitido proponer los posibles mecanismos de acción para dichas moléculas.

ABSTRACT

The identification, design, and optimization of molecules capable of modulating the responses of the ionotropic GABA receptors (GABA_A), has allowed the development of pharmacological treatments for disorders of the central nervous system (CNS), such as anxiety, insomnia and epilepsy, among others; additionally, by means of such compounds, the identification and characterization of some of the 19 subunits that make up this family has been achieved.

The $\rho 1$ subunit is one of the identification cases through the use of modulators, its initial descriptions referred to a GABA receptor which was insensitive to bicuculline and in turn activated by cis-aminocrotonic acid (CACA); however, it took almost two decades for the full identification of this receptor to be achieved, by describing some of its biophysical properties such as its low or almost no desensitization rate, as well as its particular pharmacological profile; regarding this latter aspect, the main agonist of GABA metabotropic receptors (GABA_B), baclofen has no effect on these subunits. The (1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl) methylphosphinic acid (TPMPA) was the first specific antagonist; although a considerable amount of modulators have been described, currently the search for new molecular entities continues, This interest is largely due to the new physiological roles associated with this receptor.

There are also molecules of endogenous origin with the capacity to modify the responses of the receptor to GABA, such as taurine, serotonin (5-HT), and dopamine (DA). Based on the negative modulation of the DA on the GABA_A receptor- $\rho 1$, in the present work, the effects of the metabolites of the dopaminergic pathway on such receptor are described, of which 3-methoxythiramine (3-MT) is the most potent antagonist. (259 μ M), while 3,4-

dihydroxyphenylacetic (DOPAC) and homovanilic acid (HVA) were at least 6 times less potent. By considering them as structural analogues of DA and including in the research other molecules of the dopaminergic pathway (which do not modify receptor responses), it allowed establishing the functionality and / or impact of the different regions of the molecules on their effect on the GABA_{A- ρ 1} receptors expressed heterologously in *X. laevis* oocytes.

The competition assays with the agonist suggested that the metabolites share the binding site with GABA; however, and in a complementary way the isobolograms show that there are at least two different and exclusive mechanisms for the metabolites, these mechanisms are determined by the presence of the amine and / or the acid moieties in the antagonists. Finally, the virtual coupling tests (Molecular Docking) show the possible orientations of the metabolites within the orthosteric site, which together with the rest of the experiments, has allowed to propose the possible mechanisms of action for these molecules.

La presente investigación fue financiada por:

CONACyT: Número de beca 342519, fondo para la investigación 22022 y A1-S-7659.

PAPIIT-DGAPA: Proyecto IN206616.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Instituto de Neurobiología.

Al Dr. Ricardo Miledi...uno de los más grandes honores en mi vida fue el haberle conocido...

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres...por guiarme a través de esta aventura llamada ciencia y sobre todo por su confianza, mi admiración total.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Estuardo López Vera, por sus invaluable consejos y observaciones a lo largo de esta investigación.

A la M. en C. Edith Espino, por el apoyo, sus palabras y ayuda.

Al Dr. Adán Hernández C. por las observaciones y consejos.

Doña Mary...gracias por todo el apoyo.

A los miembros y ex miembros del laboratorio D-15 a todos ellos y especialmente a:

Arturo, Alejandra, Adriana, José Luis, Ricardo, Gaby, Marianne, Freya, Alejandra (Cinthya), Ramses, Marimar.

Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez (UAEM) por apoyarme en los primeros pasos en el mundo de la ciencia.

A los miembros del jurado de examen Dr. Mariano Martínez, Dr. Arturo Hernández, Dr. Juan Carlos Gómora, y Dr. Manuel Aguilar.

A mi familia, mi gran familia...

Tere, Alvaro, Martín, José Luis, Joaquín, Gaby, Migue, Edith, Doris, Ivanhoe, Laura, Janet, Ilos, Erick, Edith, Mich, Samara, Day, Cyn, Alex, Edmar, Ivanhoe, Zany, Martín, Dhamar, Miguelin...siempre a mi lado...Gracias.

A la familia Barreto Varela, doña Lola, America, Jorge, Juandy, Doris gracias por el apoyo y la aceptación.

Pero sobre todo a Catalina Palacios Vidal, Azandra Barreto Varela y Alfredo Alaniz Barreto.

Dedicatoria.

Para Alfredo a través de tus ojos puedo ver lo asombroso que puede ser el mundo.

Para Azandra mi gran compañera, mi amor, tus opiniones y punto de vista enriquecen mi vida.

Para Catalina, uno de mis mas grandes anhelos es alcanzar la serenidad con que ves la vida.

ABREVIATURAS

+CAMP	+ <i>-cis</i> -Ácido 2-amino-metilciclopropanocarboxílico
2-PEA	2-Feniletilamina
3-AMOHF	3-(Aminometil)-1-oxo-1-hidroxi-fosfolano
3-GOHP	3-(Guanido) -1-oxo-1-hidroxi-fosfolano
3-MT	3-Metoxitiramina
5-HT	Serotonina
CACA	Ácido <i>cis</i> -aminocrotónico
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
EC₅₀	Concentración media efectiva
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA_A	Receptores ionotrópicos de GABA
GABA_A-ρ_1	Receptores ionotrópicos de GABA conformado por subunidades ρ_1
GABA_A-β_3	Receptores ionotrópicos de GABA conformado por subunidades β_3
GABA_B	Receptores metabotrópicos de GABA
HVA	Ácido homovanílico
IC₅₀	Concentración inhibitoria media efectiva
IUPHAR	Unión Internacional de Farmacología
NT	Neurotransmisor
pLGIC	Canales pentaméricos iónicos activados por ligando
SAR	Relación estructura-actividad
SNC	Sistema nervioso central
TPMPA	Ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il) metilfosfínico

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	3
2.1 Sistema GABAérgico.	3
2.2 Generalidades de los receptores GABA _A .	4
2.3 Receptores GABA _{A-p1} .	7
2.4 Características biofísicas de los receptores GABA _{A-p1} .	10
2.5 Sitio de unión del GABA.	12
2.6 Farmacología GABA _{A-p1} .	15
2.7 Relación Estructura-Actividad (SAR) y acoplamiento molecular (docking).	23
3. JUSTIFICACIÓN.	25
4. HIPÓTESIS.	26
5. OBJETIVO GENERAL.	26
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS.	27
7.1 Expresión de los receptores GABA _{A-p1} en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	27
7.2 Registros de fijación de voltaje.	28
7.3 Análisis de datos.	28
7.4 Acoplamiento molecular.	30
8. RESULTADOS.	31
8.1 Efecto de análogos sobre GABA _{A-p1} .	31
8.2 Sitio de unión.	33
8.2.1 Poro del canal.	33
8.2.2 Sitio ortostérico.	35

8.3 Acoplamiento virtual (docking).	39
8.3.1 Análogo en el sitio ortostérico.	39
8.3.2 Arreglo espacial del análogo.	44
8.4 Relación Estructura-Actividad.	51
8.5 Efecto de los análogos sobre el receptor activado.	52
8.6 Comparación de mecanismos de acción.	55
9. DISCUSIÓN.	59
10. CONCLUSIONES.	74
11. PERSPECTIVAS.	75
12. REFERENCIAS.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Receptores GABA _A , abundancia relativa y estequiometría.	7
Figura 2. Perfil característico de los receptores GABA _{A-ρ1} .	8
Figura 3. Distribución de procesos de células amacrinas secretoras de DA.	10
Figura 4. Esquema del receptor GABA _{A-ρ1} .	12
Figura 5. Sitio de unión del agonista en el receptor GABA _{A-ρ1} .	15
Figura 6. Modulación de GABA _{A-ρ1} por monoaminas.	22
Figura 7. Representación tridimensional de las moléculas evaluadas.	25
Figura 8. Trazos representativos de corrientes evocadas por GABA 3μM en ovocitos de <i>X. laevis</i> inyectados con GABA _{A-ρ1} .	32
Figura 9. Relación concentración-respuesta y efecto máximo.	33
Figura 10. Efecto del voltaje en la inhibición por análogos.	34
Figura 11. Ensayos de competencia entre GABA y 3-MT.	36
Figura 12. Ensayos de competencia entre GABA y 2-PEA.	37
Figura 13. Ensayos de competencia entre GABA y DOPAC.	38
Figura 14. Disposición general de los ligandos en el sitio ortostérico.	39
Figura 15. Disposición del fenilo de los ligandos, en conformación tipo sándwich o apilamiento.	40
Figura 16. Distancia del hidroxilo posición 4, con glutamato 196.	41
Figura 17. Distancias de los grupos amino o ácido, con Tyr 198, Ser 168, Thr 244 y Arg 104.	43
Figura 18. Cambios en los ángulos diedrales de 2-PEA.	45
Figura 19. Cambios en los ángulos diedros de 3-MT.	46
Figura 20. Cambios en los ángulos diedros de DOPAC.	47
Figura 21. Cambios en los ángulos diedros de HVA.	48

Figura 22. Modificación de distancias en los ligandos, aminos-C1 de anillo de 2-PEA y aminos-hidrógenos hidroxílicos.	49
Figura 23. Modificación de distancias en los ligandos ácidos.	50
Figura 24. Esquema de las posibles funciones de las regiones del ligando.	52
Figura 25. Co-aplicación de análogos en canal activado.	53
Figura 26. Análisis de los efectos de los análogos en receptor activado.	54
Figura 27. Comparación mecanismos de acción 3-MT, DOPAC.	56
Figura 28. Comparación mecanismos de acción 3-MT, 2-PEA.	57
Figura 29. Comparación mecanismos de acción 3-MT, 2-PEA, en diferentes estados de activación del canal.	58
Figura 30. Esquema de la Biosíntesis de las monoaminas.	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Arreglos del receptor GABA _A .	5
Tabla 2. Antagonistas competitivos del receptor GABA _{A-ρ1} .	18
Tabla 3. Análogos de GABA y agonistas del receptor GABA _{A-ρ1} .	20
Tabla 4. Efectos de los compuestos sobre el receptor GABA _{A-ρ1} .	73

1. INTRODUCCIÓN.

La comunicación neuronal está basada en el balance entre inhibición y excitación; ambos procesos modifican al potencial de membrana. La excitación en términos de carga se define por un incremento en el número de cargas positivas al interior de la célula; a este proceso se le conoce como despolarización. Mientras que su contraparte, la hiperpolarización, consiste en el incremento de cargas negativas en el interior de la célula. Uno de los mecanismos por lo cual se logra este incremento de cargas negativas se basa en el ingreso de iones de cloro, los cuales pueden entrar a través de una serie de canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGIC, acrónimo del inglés), cuyo agonista es el ácido γ -aminobutírico (GABA); este neurotransmisor (NT), tiene efecto en prácticamente todas las áreas del SNC (Nutt and Malizia, 2001).

Los receptores GABA_A son arreglos hetero u homopentaméricos; actualmente se tienen identificadas y clonadas 19 subunidades (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ y ρ 1-3) (Olsen and Sieghart, 2009). El arreglo más abundante está conformado por las subunidades α ₁, β ₂ y γ ₂ (con estequiometría, 2, 2, 1, respectivamente; Fritschy and Panzanelli, 2014); sin embargo, existe una gran diversidad de posibles arreglos diferentes, alrededor de 26 posibles combinaciones (Olsen and Sieghart, 2009, Borghese et al., 2017).

Las subunidades ρ poseen la capacidad de formar homopentámeros funcionales, con una alta sensibilidad por el ligando ($EC_{50} \approx 3 \mu M$), la cual es casi 10 veces más sensible respecto del arreglo α ₁, β ₂ y γ ₂, mostrando además una baja tasa de desensibilización (Polenzani et al., 1991). El papel fisiológico de este receptor está

asociado a procesos de memoria, sueño, dolor y transmisión visual (Gibbs and Johnston, 2005, Reis and Duarte, 2007, Chebib et al., 2009b). Estas asociaciones funcionales se establecieron a partir de su distribución dentro del SNC, mediante el uso de fármacos selectivos y electrofisiología. Estos receptores se encuentran tanto en la sinapsis y así como en el espacio extrasináptico, lo cual a su vez le confiere un papel en la transmisión tónica (Farrant and Nusser, 2005, Harvey et al., 2006). También se han encontrado en células no excitables del SNC como en astrocitos del cerebelo y del estriado (Rosas-Arellano et al., 2012, Petriz et al., 2014)

Existen una variedad de moléculas endógenas que modulan las respuestas de este receptor; de entre estas la DA (Ochoa-de la Paz et al., 2012), tiene especial relevancia dado que en la retina se ha demostrado su co-liberación con GABA en las células amacrinas (Hirasawa et al., 2012), las cuales inhiben la transmisión entre la células bipolares con las ganglionares, mediante la liberación de GABA el cual activa a los receptores $GABA_{A-p1}$ ubicados en las terminales axónicas de la células bipolares. Por tanto, es plausible considerar que este receptor está inmerso en un microambiente dopaminérgico.

En la presente investigación se realizó un estudio de relación estructura- actividad (SAR, del inglés Structure-Activity Relationship), a los metabolitos de la vía dopaminérgica con el fin de explicar los efectos de estas moléculas sobre los receptores $GABA_{A-p1}$ expresados en ovocitos de *X. laevis*. Los ensayos de competencia sugieren que los análogos se unen al sitio ortostérico, la adaptación de una estrategia basada en isobogramas sugirió la presencia de al menos dos mecanismos de acción para los

anabolitos; aunado a estos experimentos se realizaron ensayos de acoplamiento virtual (molecular docking).

La integración de los resultados permitió proponer los mecanismos de acción de los metabolitos.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Sistema GABAérgico.

El papel del GABA como NT se estableció a principios de la década de los 60's del siglo pasado, en la corteza cerebral (Krnjević and Phillis, 1963); sin embargo, también se reportaron una serie de respuestas con cierto grado de variación, dependiendo en gran medida de la zona del SNC donde se realizaba el estudio. Si bien ya era aceptada la idea de dos tipos receptores a GABA, uno de tipo ionotrópico (GABA_A) y el otro metabotrópico (GABA_B), estas diferencias no podían ser explicadas en función de sólo estos dos tipos de receptores, por lo que se propuso la existencia de subtipos de receptores en ambas familias (Olsen, 2014).

Es en este contexto donde la química farmacéutica ha aportado herramientas con las cuales se lograron evidenciar y corroborar la existencia de subtipos de receptores a GABA (Nutt, 2006, Olsen, 2014). En conjunto con técnicas de biología molecular actualmente se han identificado y clonado 19 subunidades del receptor GABA_A (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ y ρ 1-3; Olsen and Sieghart, 2009), estas comparten al menos un 30% de similitud en la secuencia de aminoácidos, y el rango se incrementa hasta 80%, al comparar subunidades del mismo subtipo (Macdonald and Olsen, 1994). Sin embargo,

para la determinación de la existencia y función de los posibles arreglos, el desarrollo de ligandos específicos continúa siendo una herramienta primordial (Olsen, 2014).

2.2 Generalidades de los receptores GABA_A.

Si bien aun no se han logrado establecer las particularidades de todos los arreglos, se sabe de manera general que los arreglos funcionales de este receptor están conformados por 5 subunidades organizadas como hetero u homo-oligómeros (Amin y Subbarayan, 2017), en cuyo centro se ubica un poro selectivo para aniones, siendo el cloruro el de mayor relevancia fisiológica debido a que éste es uno de los principales responsables en el proceso de inhibición dentro del sistema nervioso central. De manera simplificada, la inhibición se logra mediante el flujo de dicho anión, el cual se mueve en favor del gradiente electroquímico, por lo que al acumularse dentro de la neurona, impide la propagación de un potencial de acción (Bormann, 2000, Farrant and Nusser, 2005, Sigel and Steinmann, 2012, Nemezc et al., 2016). Dado que el ión se mueve a través del poro en favor del gradiente electroquímico, en casos como neuronas en desarrollo o en trastornos como la epilepsia, el ión es expulsado del interior de la célula, por lo que en estos casos, este NT tiene un efecto excitador (Cherubini et al., 1991, Ben-Ari et al., 2007); en la glía, en donde también se expresan receptores GABA_A funcionales, el flujo del cloruro sigue la misma dirección (Kettenmann and Schachner, 1985).

De manera teórica, estas 19 subunidades podrían generar más de 2 millones de arreglos diferentes. En 1998 la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR), propone como máximo 800 posibles combinaciones (Barnard et al., 1998). Veinte años más tarde, este mismo organismo estima un total de 26 arreglos diferentes clasificados en tres

categorías: 11 arreglos cuya existencia está demostrada, 6 que se consideran con alta probabilidad de existir y otras 9 como tentativas (Olsen and Sieghart, 2009; Tabla 1); a esta lista podemos agregar la conformación de heteropentámeros que contienen a la subunidad ρ las cuales se expresan en las células gliales del cerebelo (Petritz et al., 2014). Cabe mencionar que dicha lista se centra en los receptores expresados dentro del SNC, puesto que se ha demostrado la expresión de arreglos que contienen a la subunidad π en células germinales (Hedblom and Kirkness, 1997, Stephen et al., 2015).

I. IDENTIFICADO

$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	$\alpha 4\beta\gamma 2$	$\alpha 5\beta\gamma 2$	$\alpha 6\beta 3\delta$
$\alpha 2\beta\gamma 2$	$\alpha 4\beta 2\delta$	$\alpha 6\beta 2\gamma 3$	ρ
$\alpha 3\beta\gamma 3$	$\alpha 4\beta 3\delta$	$\alpha 6\beta 2\delta$	

II. ALTA PROBABILIDAD

$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$\alpha 5\beta 3\gamma 2$	$\alpha\beta$
$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$\alpha\beta 1\gamma/\alpha\beta 1\delta$	$\alpha 1\alpha 6\beta 1\gamma/\alpha 1\alpha 6\beta 1\delta$

III. TENTATIVO

$\rho 1$	$\alpha\beta\gamma 1$	$\alpha\beta\gamma\theta$
$\rho 2$	$\alpha\beta\gamma 3$	$\alpha\beta\gamma\theta$
$\rho 3$	$\alpha\beta\varepsilon$	$\alpha x\alpha y\beta\gamma 2$

Tabla 1. Arreglos del receptor GABA_A.

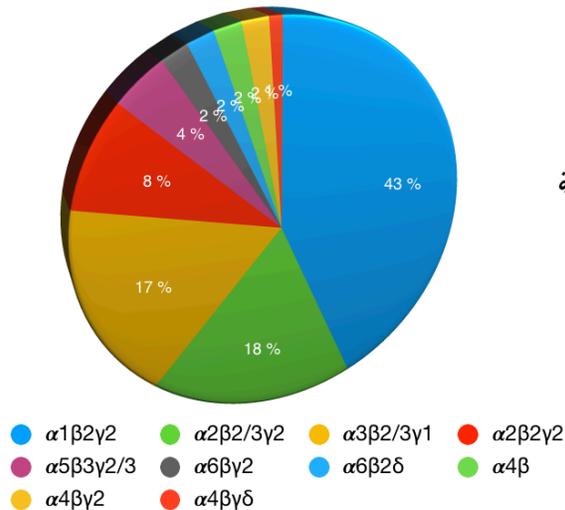
Lista y clasificación de las 26 posibles combinaciones nativas de los receptores GABA_A, establecido a partir de inclusión propuesto por Olsen & Sieghart. Modificado de Olsen & Sieghart 2008. En la categoría tentativa, las letras X, Y, implican que en un mismo arreglo pentámero existen dos tipos de subunidad α diferentes.

Las propiedades biofísicas y farmacológicas de los receptores GABA_A están determinadas por su arreglo y composición a nivel de subunidad. En general la

estequiometría de los heteropentámeros está conformada por subunidades $2\alpha_x$, $2\beta_y$ y una subunidad complementaria la cual puede ser γ , δ , ϵ o π . El arreglo más abundante en el SNC es $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, el cual representa cerca del 43% de los receptores que contienen a la subunidad α (Figura 1A); por tanto este arreglo tiene una amplia distribución dentro del SNC (Whiting, 2003, Fritschy and Panzanelli, 2014).

El resto de los receptores que contienen una subunidad diferente a α_1 (α_{2-5}), muestran una distribución más restringida; dichos arreglos, generalmente resultan excluyentes (Nutt, 2006). Por tanto, se ha inferido que uno de los papeles de las subunidades α se centra en proporcionar un patrón espaciotemporal a dichos receptores. Otra característica asociada a esta subunidad radica en que en la interfaz que forma con la subunidad adyacente se ubica el sitio de unión de las benzodiazepinas (interfaz α , γ) o del agonista (interfaz α , β); ya que es necesaria la presencia de las subunidades β para la formación del sitio de unión del GABA, el papel de esta subunidad se asocia a la expresión de receptores funcionales (Nguyen and Nicoll, 2018); esta misma subunidad está implicada en la cinética de decaimiento de la corriente del receptor, lo cual tiene implicaciones en el procesamiento de la información así como en la codificación temporal (Xie and Manis, 2013); por su parte los arreglos que contienen a las subunidades γ se ubican generalmente dentro de las sinapsis, y su papel está asociado a la inhibición fásica; de manera análoga la presencia de la subunidad δ , dirige la localización del arreglo preferentemente en sitios extrasinápticos con un papel importante en la inhibición tónica (Whiting, 2003).

A Porcentajes de abundancia relativa



B Estequiometría y arreglo espacial

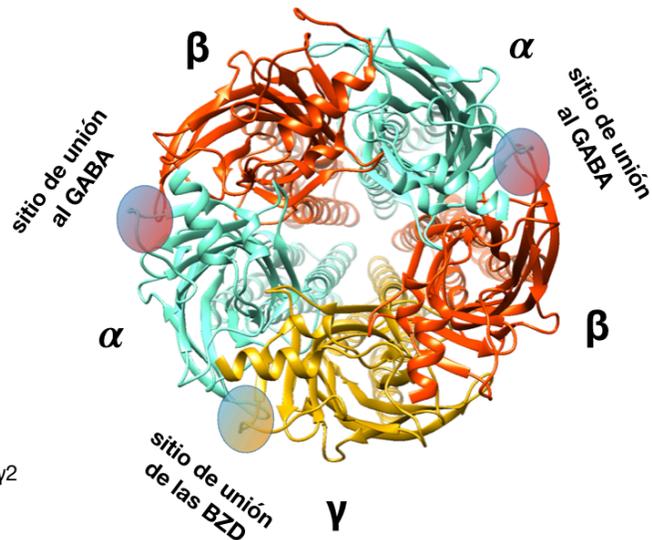


Figura 1. Receptores GABA_A, abundancia relativa y estequiometría.

A. Abundancia relativa de los receptores que contienen a la subunidad α , modificado de Whiting 2003, **B.** Estequiometría de la combinación de subunidades más abundantes ($\alpha_x\beta_y\gamma_z$), se muestran los sitios de unión, entre las interfaz β/α , sitio de unión del GABA, en la interfaz α/γ , sitio de unión de las benzodiazepinas (BZD), modificado de Miller & Aricescu, 2014.

2.3 Receptores GABA_{A-p1}.

Desde mediados de la década de los 70's existieron reportes que mencionaban receptores GABA_A que eran activados por el ácido *cis* amino crotonico (CACA análogo del GABA) e insensibles a la bicuculina (alcaloide, antagonista competitivo de los receptores GABA_A), en regiones como la medula espinal del gato y el cerebelo de la rata (Johnston et al., 1975, Drew and Johnston, 1992); no obstante la plena identificación de dicho receptor se logró hasta 1991, mediante la expresión heteróloga de mRNA de la retina de bovinos en ovocitos de *X. laevis* mostrando de manera inequívoca la insensibilidad tanto a bicuculina así como al baclofeno, agonista de los receptores

GABA_B. Por sus particularidades farmacológicas, además de algunas características biofísicas, originalmente se propuso a éste como una nueva clase de receptor llamado GABA_C, y a las subunidades se les denominó como ρ (para denotar su origen en la retina; Polenzani et al., 1991b; Figura 2).

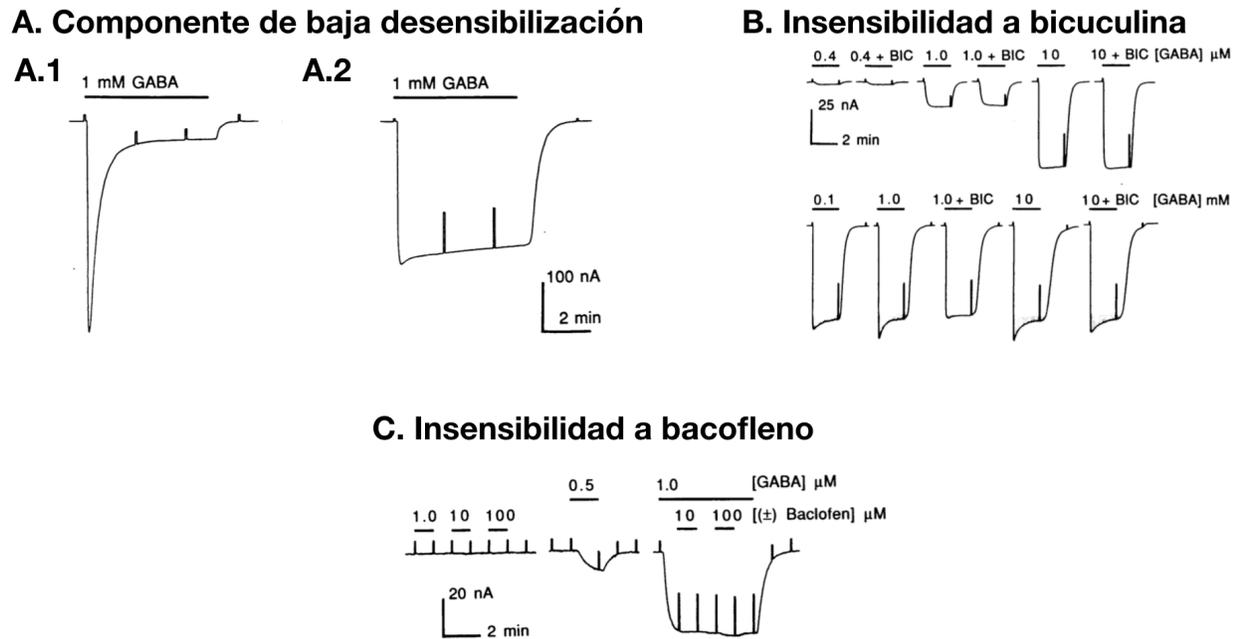


Figura 2. Perfil característico de los receptores GABA_{A-p1}.

A. Comparación de corrientes generadas por la aplicación de GABA 1mM a ovocitos de *X. laevis*, inyectados con mRNA de: **A.1** Corteza cerebral, con un alto porcentaje de desensibilización; **A.2.** mRNA retina, con baja tasa de desensibilización; **B y C** Perfil farmacológico del receptor, **B.** Insensibilidad a la bicuculina. **C.** Insensibilidad al agonista del receptor GABA_B. Modificado de Polenzani et al. 1991.

La distribución de este receptor, dentro del SNC se ha demostrado en regiones como el hipocampo, la médula espinal, el colículo superior, la hipófisis, el cerebelo, la amígdala y la corteza visual (Boue-Grabot et al., 1998, Rozzo et al., 2002, Rosas-Arellano et al., 2007, Mejía et al., 2008, Rosas-Arellano et al., 2011), e incluso, se ha detectado y evaluado en regiones fuera del SNC, como el sistema gastrointestinal,

cardiovascular e inclusive los espermatozoides (Gamel-Didelon et al., 2003, Li et al., 2008, Reyes-Haro et al., 2014).

A nivel de sinapsis, este arreglo puede encontrarse tanto dentro de la sinapsis como en la periferia de ésta; esto último aunado al hecho de su alta sensibilidad por el ligando (es cerca de 10 veces más sensible que el arreglo más abundante), sugieren el posible papel de este receptor en la transmisión tónica; dicho papel ya ha sido demostrado (Boller and Schmidt, 2001, Alakuijala et al., 2006, Hull et al., 2006). Una de las zonas en que se puede observar la activación tónica del receptor $GABA_{A-p1}$, es la retina, específicamente en las terminales axónicas de las células bipolares (Jones and Palmer, 2011). Esta región presenta una serie de particularidades que son importantes a considerar al evaluar el papel de la inhibición tónica, ya que el agonista que activa a estos receptores proviene de las células amacrinas, capaces de liberar no sólo al GABA, sino también a la DA (Hirasawa et al., 2012, Hirasawa et al., 2015). Este fenómeno toma relevancia si consideramos que la DA modula de manera negativa al receptor $GABA_{A-p1}$ (Ochoa-de la Paz et al., 2012); es decir en la retina se tienen las condiciones para disminuir la inhibición tónica por la acción de la DA o sus metabolitos sobre los receptores $GABA_{A-p1}$ (Figura 3).

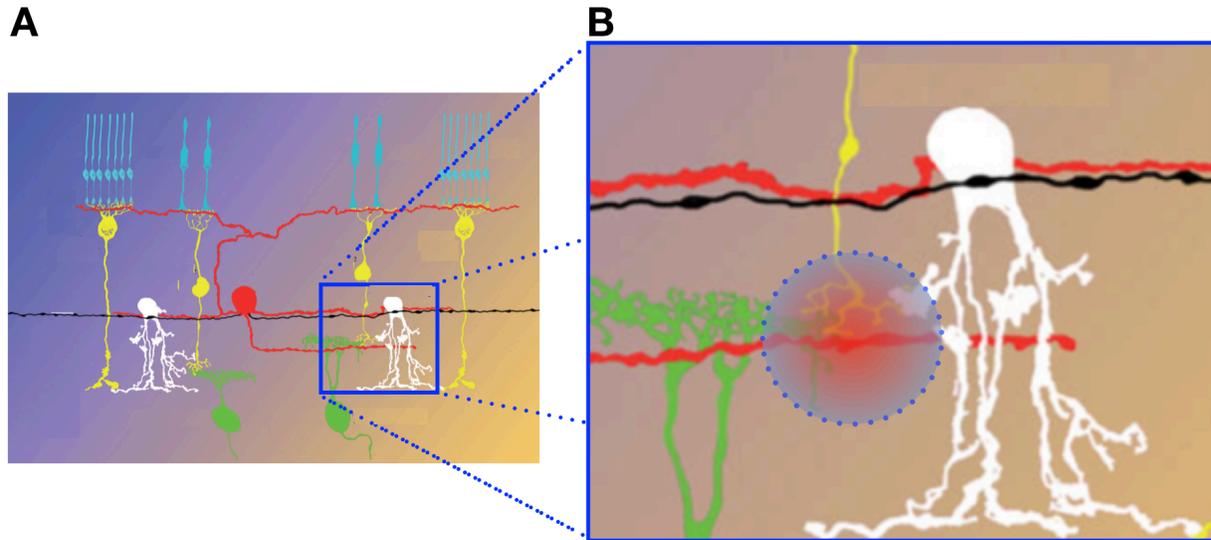


Figura 3. Distribución de procesos de células amacrinas secretoras de DA.

A. Esquema de la composición celular de la retina; conos/bastones: cian; bipolares: amarillo; amacrinas: blanco; amacrinas liberadoras de DA: rojo; ganglionares: verde. **B.** Zona de contacto entre la célula amacrina y los axones de las células bipolares (en amarillo), región de alta expresión de receptores $GABA_A-\rho_1$. Modificado de Hirasawa et al. 2015.

2.4 Características biofísicas de los receptores $GABA_{A-\rho_1}$.

Estructuralmente las subunidades de la familia de los receptores $GABA_A$ tienen tres dominios, los cuales poseen particularidades estructurales para cada una de las subunidades. Estrada-Mondragón estima la longitud y detalles estructurales de cada uno de los dominios de la subunidad ρ_1 :

- 1) El dominio extracelular de 80 Å, 2) El dominio transmembranal de 40 Å, y 3) El asa intracelular que conecta a los pases transmembranales 3 y 4 con una longitud de 35 Å (Estrada-Mondragón, 2011; Figura 4 A).

El primero de estos dominios corresponde al extremo N terminal, siendo un dominio de gran tamaño formado por 10 láminas β unidas por asas; entre las láminas 6-7 se encuentran dos cisteínas separadas por 13 residuos (Figura 4 B) que forman un puente disulfuro, el cual ha sido usado como característica básica para nombrar a este tipo de

receptores como “cys-loop” (actualmente la denominación pLGIC, acrónimo del inglés “pentameric Ligan Gated Ion Channels”, es más común para referirse a estos receptores; Hilf and Dutzler, 2009), y dos hélices α , (Martínez-Delgado et al., 2010, Naffaa et al., 2017). El sitio ortostérico se encuentra en este dominio, ubicado en la interfaz de dos subunidades; por tanto, se infiere que existen 5 sitios de unión idénticos para el agonista, además de algunos sitios alostéricos. Este dominio, en la zona del poro y adyacente a este vestíbulo posee un potencial electrostático positivo, el cual se explica por la naturaleza polar en la mayoría de los residuos que lo conforman, lo cual confiere un efecto de preselección iónica (O'Mara et al., 2005, Hansen et al., 2008).

El segundo de los dominios está conformado por 4 pases transmembranales (M1-4); esta región es altamente conservada entre las 19 subunidades de los receptores GABA_A con una homología del 75 % (Le Novère and Changeux, 1999). Este dominio se encarga de estabilizar al receptor en la membrana plasmática mediante hélices α , las cuales forman un entorno hidrofóbico (M1, 3 y 4, Figura 4 C). Esta región es a su vez el sitio de unión de algunos moduladores con alto perfil de hidrofobicidad, como esteroides, pentobarbital y hexanitrodifenilamina (DPA) (Limon et al., 2016, Naffaa et al., 2017); el alcohol por su parte tiene su sitio de unión formado entre los pases M2 y M3 (Borghese et al., 2016); dicho pase M2 es el que forma al poro del canal, cuya estructura determina la selectividad iónica, el cual para el caso específico de la subunidad ρ_1 se sitúa la arginina³¹³, la cual forma un anillo electrostático cuyo diámetro estimado es de 0.61 nm, cuando el canal se encuentra en estado abierto (Hansen et al., 2008, Peters et al., 2010). También confiere algunas otras características tales como la conductancia, la sensibilidad a la picrotoxina, que están relacionados con la prolina²⁹⁴ (Zhu et al., 2007);

otra de las características que le confiere esta región al receptor es la desensibilización (Martínez-Torres et al., 2000).

El asa intracelular que conecta a los pases M3 con M4, es conocido como unidad accesoria a la membrana (MA), la cual tiene una secuencia de aminoácidos variable entre subunidades; si bien su papel aún es controversial en algunos aspectos como el hecho de no ser esencial para el ensamblaje final del receptor (Jansen et al., 2008), el papel de esta región está asociada tanto a la modulación intracelular de la actividad del receptor, así como a la localización del receptor en la sinapsis (Enz and Cutting, 1998, Peters et al., 2010). Otra de las funciones de esta región se asocia con la correcta bidireccionalidad del flujo iónico, debido a que al igual que el dominio extracelular, funciona como un prefiltro (Estrada-Mondragón, 2011).

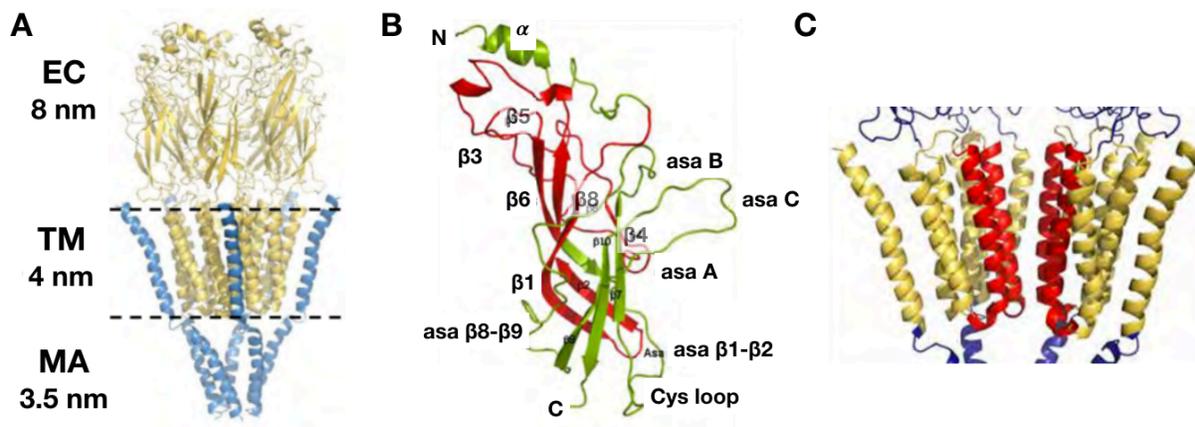


Figura 4. Esquema del receptor GABA_{A-p1}.

A. Esquema general de los dominios del receptor GABA_{A-p1}: EC: extracelular, TM: transmembranal, MA: dominio del asa intracelular. **B.** Detalles del dominio EC, conformado por 10 láminas β , conectadas por asas, las de mayor relevancia nombradas con letras latinas. **C.** Detalles del dominio TM, en rojo el pase transmembranal M2, formador del poro. Modificado de Estrada-Mondragón. 2011.

2.5 Sitio de unión del GABA.

El sitio ortostérico se encuentra en la interfaz de las subunidades (Figura 5A) formado por alrededor de 20 aminoácidos que tienen en mayor o menor medida un

impacto en el proceso de activación del receptor (Figura 5 B, Sedelnikova et al., 2005, Osolodkin et al., 2009); al igual que otros pLGIC, el sitio ortostérico es una región con abundantes residuos aromáticos, comúnmente denominada “caja aromática”, conformada por al menos 5 residuos, que para el caso del receptor GABA_{A-ρ1}, son la fenilalanina¹³⁸ y las tirosinas^{102, 198, 241, 247} (Harrison and Lummis, 2006b, Lummis et al., 2011). Cabe resaltar que esta caja difiere del modelo originalmente descrito en el receptor nicotínico por la ausencia de un triptófano, el cual es el generador de la interacción π -catión más favorable energéticamente; dicha interacción es considerada como la de mayor relevancia en el proceso de anclaje del agonista. Sin embargo, en el caso del receptor GABA_{A-ρ1} dicho papel es asignado al residuo serina²⁶⁸ (Sedelnikova et al., 2005), pese a que la interacción resultante es de menor intensidad a la encontrada para el modelo con el triptófano en los receptores nicotínicos; no obstante, en revisiones posteriores del tema se sugirió, basado en los modelos de interacción de múltiples residuos con un anión, la posibilidad de una interacción complementaria con la amina protonada del GABA (Gallivan and Dougherty, 1999). Esta interacción complementaria se llevaría a cabo con el residuo que ocupa la posición homóloga del triptófano en el receptor nicotínico, que para GABA_{A-ρ1} es la tirosina¹⁹⁸; esta variación plantea un escenario diferente para la función de la caja aromática en GABA_{A-ρ1}, por lo que esta caja posee una mayor flexibilidad, lo que podría dar a sus componentes individuales la posibilidad de participar en otros procesos (Lummis et al., 2011).

Las interacciones más fuertes que puede establecer el agonista con el receptor, son los puentes de hidrógeno, los cuales se logran con la arginina¹⁰⁴ (Harrison and Lummis, 2006b, Melis et al., 2008, Osolodkin et al., 2009, Lummis et al., 2011). La

presencia de un segundo puente de hidrógeno, también ha sido ampliamente aceptada; sin embargo, el residuo con el cual se genera esta interacción es controversial, y existen varias propuestas, como por ejemplo, una segunda arginina ubicada en la posición 158 (Harrison and Lummis, 2006a), dos serinas diferentes, una que ocupa la posición 243 (Melis et al., 2008) y la otra en la posición 168 (Osolodkin et al., 2009); una de las últimas propuestas es el residuo 244 (treonina). En este modelo se sugiere que la formación del puente de hidrógeno se establece al final del proceso de anclaje del agonista, con lo que comienza el proceso de activación del canal (Naffaa et al., 2016).

En años recientes se ha propuesto la existencia de una segunda región de alta hidrofobicidad, parecida a la caja aromática, cuyo papel está asociado en el proceso de activación y desactivación del receptor. Esta área está conformada principalmente por las fenilalanina^{76, 124}, y las tirosinas^{153, 198}; esta última originalmente pertenece a la caja aromática “canónica”, lo que apoya la noción de la flexibilidad de la caja (Carland et al., 2015).

En este contexto es preciso hacer mención que la postulación del funcionamiento del sitio de unión ha sido refinado en función de experimentos basados en mutaciones sitio-dirigidas, los cuales a su vez son contrastados con el modelaje virtual del receptor basado en homología.

El proceso de unión del GABA en su sitio de unión es secuencial en el cual una vez que el ligando ocupa su lugar dentro de la cavidad ortostérica, el primer evento es la interacción de la región amino del GABA con el residuo de la serina¹⁶⁸. El proceso de estabilización se ve finalizado con el aporte de la tirosina¹⁹⁸; este evento es auxiliado por la “caja aromática”; el segundo evento del proceso está basado en interacciones de

mayor intensidad en las que participa, protagónicamente, la región del ácido carboxílico, con la arginina¹⁰², finalizando con la interacción con la treonina²⁴¹ (Figura 5 C); este último evento genera un desplazamiento de la asa F, lo que provoca los subsecuentes eventos que finalizan con la apertura del poro del canal.

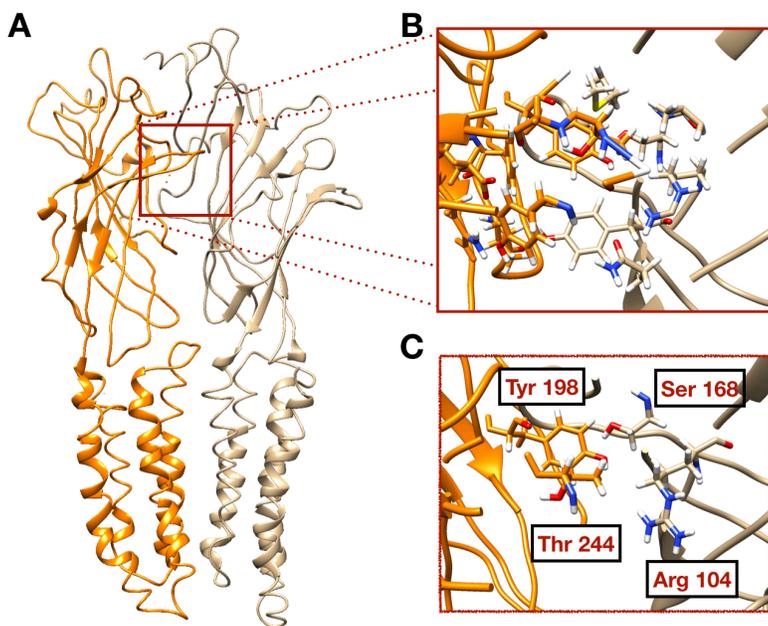


Figura 5. Sitio de unión del agonista en el receptor GABA_{A-p1}.

Para optimizar la perspectiva se omiten 3 subunidades. **A.** Interfaz y región del sitio de unión del ligando. **B.** Ampliación del sitio de unión, considerando los 20 residuos que de manera directa e indirecta participan en el proceso de unión del ligando (Sedelnikova et al. 2005). **C.** Los 4 principales residuos implicados en el proceso de anclaje e inicio del movimiento de apertura del canal; la imagen se roto sobre el eje Z; considérese que los residuos se encuentran esencialmente en el mismo plano horizontal respecto de la membrana. El modelo empleado es el descrito por Limón et al. 2016, con los residuos considerados por Sedelnikova et al. 2005.

2.6 Farmacología GABA_{A-p1}.

Se han descrito algunas docenas de compuestos con habilidad para modular al receptor GABA_{A-p1} (Johnston et al., 2010, Naffaa et al., 2017); sin embargo, pocos de ellos poseen un alto grado de selectividad por este arreglo. A continuación, se mencionan

solo algunas de estas moléculas, de las cuales (en el caso de las que comparten el sitio de unión con el agonista), se describen algunas de las bases en términos de farmacóforos, que permitieron el desarrollo de estas entidades.

Tras la caracterización funcional, de los receptores GABA_{A-p1} en 1991, basada entre otras características por su farmacología, bastó de un lustro para la descripción del TPMPA como el primer antagonista selectivo para este receptor (Ragozzino et al., 1996) con una concentración inhibitoria media efectiva (IC₅₀) de 2.22 μM (Murata et al., 1996). Dado que este compuesto se une al sitio ortostérico, es clasificado como antagonista competitivo; además ha sido ampliamente usado para describir las implicaciones fisiológicas del receptor en la retina (Matsui et al., 2001), en el núcleo geniculado lateral (Schlicker et al., 2004), en el cerebelo (Harvey et al., 2006) y en el hipocampo (Xu et al., 2009).

Esta molécula ha sido el prototipo para el desarrollo de otros antagonistas competitivos. El ácido fosfínico es el farmacóforo del TPMPA (Locock et al., 2013); con él que se han obtenido ligandos como el 3- (aminometil)-1-oxo-1-hidroxi-fosfolano (3-AMOHP), con una IC₅₀ diez veces mayor que el TPMPA y el 3- (guanido) -1-oxo-1-hidroxi-fosfolano (3-GOHP), con una potencia 15 veces menor; estos compuestos pueden diferenciar entre las subunidades p1 y p2 con una afinidad 3 veces mayor por la primera, sobre el receptor α₁β₂γ₂, el 3-AMOHP no mostró efecto a una concentración de 600 μM y el 3-GOHP disminuyó la respuesta en un 29 % (Gavande et al., 2011). Otros compuestos obtenidos bajo este mismo supuesto se basaron en el cambio del metilo, por un pentilo como sustituyente en el ácido fosfínico, además del reemplazo de la amina secundaria cíclica por una lineal primaria, considerando que en este compuesto existe la

posibilidad de enantiómeros; el ácido *cis*-(3-aminociclopentanol) metilfosfónico, mostró una IC_{50} de 5.6 μM sobre el receptor $GABA_{A-\rho 1}$, siendo dos veces más potente respecto del efecto mostrado en el receptor $GABA_{A-\rho 2}$. Con respecto a su isómero *trans*, fue casi 15 y 37 veces más potente, sobre los receptores $GABA_{A-\rho 1}$ y $GABA_{A-\rho 2}$ respectivamente (Chebib et al., 2009a) e inclusive es agonista de los receptores $GABA_{A-\alpha 1\beta 2\gamma 2}$ (Kusama et al., 1993).

El reemplazo bioisostérico del ácido fosfónico, por el ácido carboxílico, ha generado estructuras como la 4-aminociclopent-1-enocarboxamida (4-ACPAM), y la 4-amino-N-hidroxyciclopent-1-enocarboxamida (4-ACPHA), de las cuales la primera es más potente (IC_{50} , 10 μM vs 13 μM , respectivamente); sin embargo, la primera no es selectiva para las subunidades ρ , ya que es un antagonista del receptor $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ con una IC_{50} de 23 μM (Locock et al., 2013).

Una estrategia diferente al reemplazo de la zona ácida es el cambio de la región amino, por un imidazol, que mostró que el ácido acético-4-imidazol, (IAAA), inhibe al receptor $GABA_{A-\rho 1}$, con IC_{50} de 1.45 μM ; sin embargo, no discrimina entre las diferentes subunidades ρ , pues inhibe a las subunidades $\rho 2$ y $\rho 3$ con una IC_{50} de 3.18 y 12.6 μM respectivamente (Chebib et al., 1998b). En la Tabla 2 se muestran las estructuras de los antagonistas mencionados (Tabla 2).

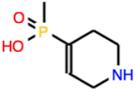
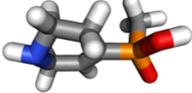
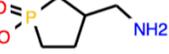
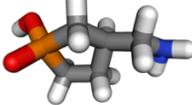
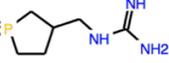
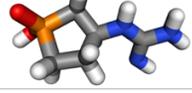
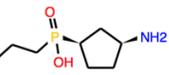
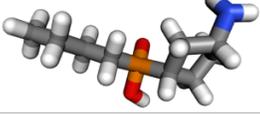
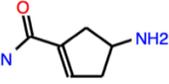
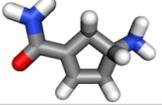
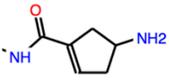
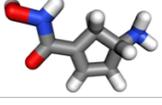
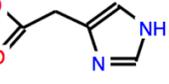
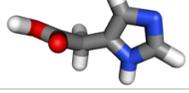
COMPUESTO	ESTRUCTURA		EFECTO SOBRE RECEPTOR GABA _A	
	2D	3D	ρ1	α1β2γ2
TPMPA (Ragozzino, et al., 1996)			IC ₅₀ = 2.22 μM	Inactivo
3-AMOHP (Gavande, et al., 2011)			IC ₅₀ = 19.91 μM	Inactivo (a 600 μM)
3-GOHP (Gavande, et al., 2011)			IC ₅₀ = 29.74 μM	Inhibe 29.21 % (a 600 μM)
cis-ACPBP (Chebib, et al., 2009)			IC ₅₀ = 5.6 μM	Inactivo
4-ACPAM (Locock, et al., 2013)			IC ₅₀ = 10 μM	IC ₅₀ = 23 μM
4-ACPHA (Locock, et al., 2013)			IC ₅₀ = 13 μM	Inactivo
I4AA (Chebib, et al., 1998, Kusama, et al., 1993)			IC ₅₀ = 1.45 μM	EC ₅₀ = 138 μM

Tabla 2. Antagonistas competitivos del receptor GABA_{A-ρ1}.

El primer agonista descrito para el receptor GABA_{A-ρ1} fue el CACA, el cual es un análogo en conformación *cis* del GABA (doble enlace entre los carbonos C2-C3). No muestra actividad sobre los receptores α₁β₂γ₂, y es agonista parcial (70%) del receptor GABA_{A-ρ1}, pero no discrimina entre los otros dos tipos de subunidades de ρ. Además, es inhibidor de los transportadores de GABA. Por su parte el enantiómero *trans* (ácido *trans*-4-aminocrotónico, TACA) es un agonista completo, que al igual que el CACA, no discrimina entre subunidades ρ, tiene potencia similar para las subunidades ρ₁ y ρ₂ (EC₅₀, 0.44 y 0.3 μM, respectivamente), y es casi 10 veces menos potente sobre la subunidad

ρ_3 ; sin embargo, activa al arreglo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con una EC_{50} de 133 μM (Kusama et al., 1993, Chebib et al., 1998a, Vien et al., 2002). Dado que el principio de selectividad del CACA se basa en la disminución de la flexibilidad de la molécula condicionándola a un estado constreñido y en la disminución de los ángulos de rotación de los carbonos, se propuso que la inclusión de un ciclopropilo podría generar un efecto similar al doble enlace, y por consiguiente mayor especificidad. De esta inclusión se obtienen cuatro enantiómeros, de los cuales el +-*cis*-ácido 2-amino-metilciclopropanocarboxílico (+/--CAMP), no distingue entre subunidades ρ , con una EC_{50} de 40, 17 y 28 μM , para las subunidades ρ_1 , ρ_2 y ρ_3 , respectivamente, y a diferencia del CACA, este compuesto es un agonista completo (Duke et al., 2000). Curiosamente un análogo del I4AA, metilado en la posición 5 (5-Me-I4AA), es una agonista completo con mayor potencia sobre los receptores $\text{GABA}_{A-\rho_1}$ que el +-CAMP, con una EC_{50} de 22 μM (Madsen et al., 2007); en la Tabla 3 se muestran las estructuras de los agonistas mencionados.

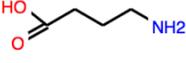
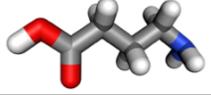
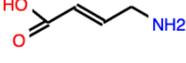
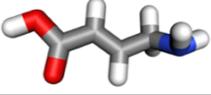
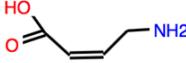
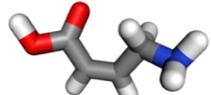
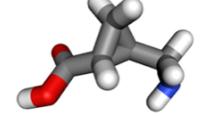
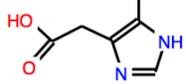
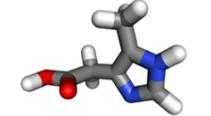
COMPUESTO	ESTRUCTURA		EFECTO SOBRE RECEPTOR GABA _A	
	2D	3D	ρ1	α1β2γ2
GABA (Kusama, et al., 1993)			EC ₅₀ = 2.5 μM	EC ₅₀ = 21.1 μM
CACA (Chebib, et al., 1998)			EC ₅₀ = 74 μM (eficacia de 70%)	Inactivo
TACA (Ragozzino, et al., 1996)			EC ₅₀ = 0.44 μM	EC ₅₀ = 133 μM
+ - CAMP (Duke, et al., 2000)			EC ₅₀ = 40 μM	EC ₅₀ > 1mM (Agonista débil)
5-MeI4AA (Madsen, et al., 2007)			EC ₅₀ = 22 μM	EC ₅₀ > 1mM (Agonista débil)

Tabla 3. Análogos de GABA y agonistas del receptor GABA_A-ρ1.

Todos los compuestos anteriormente citados tienen una característica en común, ejercen sus efectos al unirse al sitio ortostérico. Existen una variedad de moléculas consideradas como moduladores alostéricos; son de tamaños variables y van desde iones metálicos hasta moléculas orgánicas; dentro de los iones metálicos se encuentra el Zinc, el cual disminuye la respuesta evocada por el GABA, interaccionando con la histidina¹⁵⁶ (Wang et al., 1995), otros iones como el Lantano, el Lutecio y el Gadolinio actúan como potenciadores de la respuesta a GABA (Goutman et al., 2005). Sin embargo, el sitio de unión de estos lantánidos no se ha logrado identificar.

Por su parte, moléculas orgánicas como el etanol inhiben al receptor GABA_{A-p1}, cuyo sitio de unión está en la región transmembranal (Borghese et al., 2016), lo cual se explica por ser una molécula con una porción altamente lipofílica. Este mismo argumento se aplica a compuestos de tipo flavonoide o esteroideo, los cuales modulan los receptores GABA_{A-p1}, así como otras subunidades (Goutman et al., 2003, Johnston et al., 2010). El que estos compuestos tengan efecto en diversos subtipos de receptores GABA_A, se explica en función de la alta similitud en secuencia de los pases transmembranales (Le Novère and Changeux, 1999); no obstante las pequeñas diferencias en las secuencias confieren variaciones en la magnitud de la modulación e incluso efectos opuestos para una misma molécula. Por ejemplo, la crisina a una concentración de 30 μ M inhibe al receptor constituido por las subunidades $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, en un 12.1 %, e inhibe en un 23.3 % al receptor GABA_{A-p1}. Otro caso es la flavona que muestra efectos contrarios, ya que en el receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, a una concentración de 10 μ M, funciona como modulador positivo, y esa misma concentración disminuye la respuesta en el receptor GABA_{A-p1} (Goutman et al., 2003). Dentro de los esteroides, la 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (epipregnanolona) que es un modulador positivo en el receptor GABA $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, y modulador negativo en el receptor GABA_{A-p1}, (Johnston et al., 2010); cabe mencionar que este esteroide es de naturaleza endógena.

Se han descrito algunos otros moduladores del receptor GABA_{A-p1}, tales como la glicina, β alanina y taurina (Calvo and Miledi, 1995, Ochoa-de la Paz et al., 2008), de las cuales la taurina, mostró un efecto bimodal. Otros moduladores endógenos son la serotonina (5-HT), la dopamina (DA), la octopamina y tiramina, las cuales son moléculas

que comparten con la DA, el mismo núcleo (4 fenol, Figura 6, Ochoa-de la Paz et al., 2012).

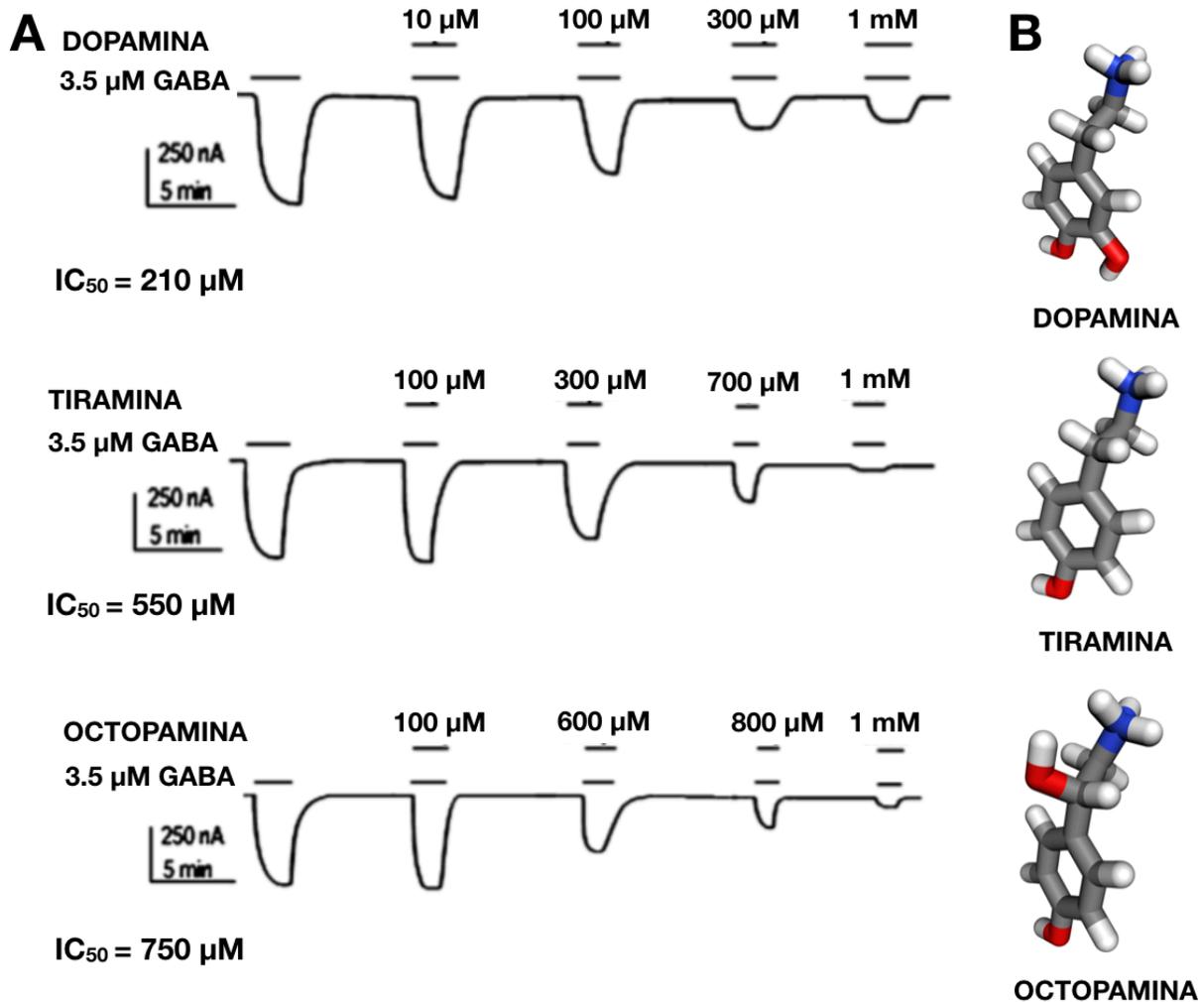


Figura 6. Modulación de GABA_{A-p1} por monoaminas.

A. Efecto de la co-aplicación sobre la amplitud de corriente del receptor GABA_{A-p1} expresado en ovocitos de *X. laevis*. Las monoaminas se aplicaron en concentraciones crecientes, en presencia de una concentración de 3.5 μ M de GABA. Tomado de Ochoa-de la Paz et al, 2012. **B.** Estructuras químicas de las monoaminas en forma de bastón.

Estos hallazgos muestran que existen moléculas endógenas con capacidad para modular a los receptores GABA. Por tanto éste proceso debe ser entendido con mayor precisión (Sigel and Steinmann, 2012) de tal suerte que los estudios de relación estructura-función-actividad son importantes para lograr este fin.

2.7 Relación Estructura-Actividad (SAR) y Acoplamiento molecular (docking).

Los estudios de relación estructura-actividad han permitido la optimización de ligandos, partiendo de la identificación de los farmacóforos, para posteriormente realizar reemplazos bioisotéricos. En otros casos se utiliza la modificación de algunas propiedades del ligando, tales como variar su flexibilidad, tamaño o la orientación de alguna parte (Ragozzino et al., 1996, Duke et al., 2000, Naffaa et al., 2017).

Estas estrategias pueden ser complementadas con aproximaciones *in silico*, las cuales pueden aportar información adicional; sin embargo, para poder realizar este tipo de estudios es necesario contar con modelos tridimensionales del receptor, los cuales pueden obtenerse a través de la resolución de sus estructuras cristalográficas. En el caso de los pLGIC al ser proteínas integrales de la membrana, su cristalización supone un desafío adicional; en el caso específico del receptor GABA_{A- ρ 1}, no se ha logrado tal cristal; sin embargo, el modelaje por homología con otros LGIC ha permitido la generación de aproximaciones del receptor cuya exactitud depende en gran medida de la proteína que se emplee como molde, considerando no solo la similitud de secuencia con ésta, sino también el grado de resolución con que se haya logrado resolver el modelo base (Estrada-Mondragón, 2011, Puthenkalam et al., 2016, Naffaa et al., 2017).

La combinación de las anteriores estrategias, aunadas a pruebas funcionales *in vitro*, permiten la posibilidad de proponer nuevas entidades moleculares con la capacidad de modificar el funcionamiento de los receptores y también es posible proponer los mecanismos por los cuales estos ejercen su función.

3. JUSTIFICACIÓN.

El hecho de que la DA modula al receptor $GABA_{A-p1}$ sirve como base para sugerir que otras moléculas de origen endógeno y con una estructura similar pudiesen tener esta propiedad. En este trabajo se exploró la habilidad de la L-DOPA, 2-PEA, 3-MT, DOPAC, HVA, adrenalina y noradrenalina (Figura 7), para modular a $GABA_{A-p1}$ expresado en ovocitos de *X. laevis*. Este estudio podría permitir la identificación del farmacóforo de dichas entidades y ahondar en los mecanismos implicados en esta modulación. El tener información más precisa acerca de estos mecanismos, podría entre otras cosas, aportar diseños alternativos de moléculas con capacidad para modificar las respuestas de los receptores, e inclusive mejorar la selectividad no solo a las subunidades sino también a los diferentes estados conformacionales de los receptores.

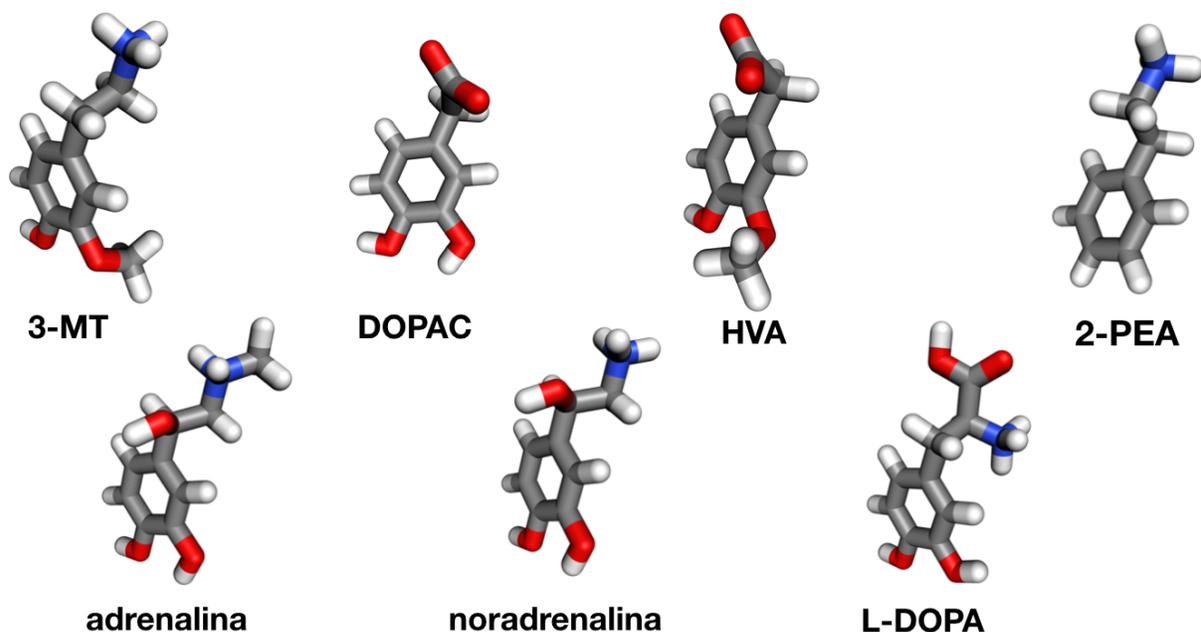


Figura 7. Representación tridimensional de las moléculas evaluadas.

Representación tridimensional, en bastones de las moléculas evaluadas en esta tesis las cuales comparten el núcleo etil-benceno.

4. HIPÓTESIS.

La 2-feniletilamina (2-PEA), la 3-metoxitiramina (3-MT), el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA), se unen al sitio ortostérico del receptor GABA_{A-ρ1} de humano, expresado en ovocitos de *X. laevis*.

5. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de los análogos estructurales de la dopamina sobre las corrientes generadas por el GABA en el receptor GABA_{A-ρ1}, expresado en ovocitos de *X. laevis*.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar el efecto del L-DOPA, 2-PEA, 3-MT, DOPAC, HVA, adrenalina y noradrenalina sobre el receptor GABA_{A-ρ1}.
2. Realizar ensayos de acoplamiento virtual (docking) para los compuestos con actividad sobre el receptor para proponer un mecanismo de acción.
3. Realizar un estudio relación estructura-actividad basado en los compuestos evaluados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

Todas las moléculas se adquirieron en Sigma-Aldrich (GABA, A5835-25G; DA, PHR1090-1G; 3-MT, 4251-100MG; DOPAC, 850217-1G; HVA, H1252-1G; 2-PEA, P6513-25G; adrenalina, E4250-500MG; noradrenalina, A7257-500MG y L-DOPA, D-9628-5G). El GABA 1M se almacenó en alícuotas a -30 °C, las demás moléculas se prepararon en el momento y el pH final fue ajustado a 7.4.

7.1 Expresión de los receptores GABA_{A-p1} en ovocitos de *X. laevis*.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las políticas de ética establecidas por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Tanto el protocolo seguido en este proyecto así como el plásmido que se usó para la obtención del mRNA están basados en lo reportado por Martínez Torres (Martínez-Torres et al., 2000).

Las ranas fueron anestesiadas por inmersión en baño de hielo por 30 min; los folículos fueron removidos manualmente y defoliculados enzimáticamente (colagenasa tipo 1, 0.3 µg/µL en solución Ringer sin Ca²⁺, a temperatura ambiente por 30 min); los ovocitos se mantuvieron a 16 °C en medio de Barth: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca₂(NO)₃, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, pH 7.4, y 0.1 mg/mL de sulfato de gentamicina. Al día siguiente se inyectó 100 ng de mRNA de GABA_{A-p1} (1 µg/µl) en la región ecuatorial del ovocito; los registros electrofisiológicos se realizaron en un periodo de entre 1 y 5 días posteriores a la inyección.

7.2 Registros de fijación de voltaje.

Las corrientes de membrana producidas por el agonista fueron registradas usando la técnica de fijación de voltaje con 2 microelectrodos descrita por Miledi (Miledi et al., 1982). Los ovocitos fueron colocados en una cámara de registro de 0.5 mL, e impalados con dos microelectrodos de vidrio, con resistencias en el rango de 0.5 a 2.0 MΩ, los cuales se llenaron con una solución de KCl 3 M; el potencial de membrana fue fijado a -60 mV. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente (10-25 °C), con una perfusión continua con un gasto de 20 ml/min, con una solución Ringer: 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4.

7.3 Análisis de datos.

Todos los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 6.0. (GraphPad Software Inc., San Diego CA). Los datos se expresan con la media ± error estándar. Cada dato fue obtenido de al menos 6 células de al menos 2 ranas; todas las mediciones del efecto las concentraciones de las moléculas evaluadas fueron respecto de la respuesta obtenida por la aplicación de GABA 3μM; el porcentaje de inhibición se determinó mediante la ecuación:

$$\text{Inh[Ana]i} = 2I_{[\text{Ana}]i} / (I_{[\text{GABA } 3\mu\text{M}]pre} + I_{[\text{GABA } 3\mu\text{M}]post}) \dots\dots\dots \text{Ec. 1}$$

en donde: Inh[Ana]i : el % de inhibición del análogo a i concentración en co-aplicación de GABA 3μM; $I_{[\text{Ana}]i}$, corriente obtenida por la co-aplicación del análogo a i concentración en co-aplicación de GABA 3μM, $I_{[\text{GABA } 3\mu\text{M}]pre}$: corriente obtenida por la aplicación de

GABA 3µM antes de la co-aplicación, I [GABA 3µM]post: corriente obtenida por la aplicación de GABA 3µM después de la co-aplicación. Los valores de inhibición se utilizaron para graficar las curvas concentración-respuesta según la ecuación:

$$Y = 100 / (1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) * nH)}) \dots\dots\dots \text{Ec. 2}$$

Donde X es el logaritmo de la concentración del análogo, IC_{50} es la concentración de antagonista ([Ana]) que causa la inhibición del 50% del máximo de GABA, y nH es el coeficiente de Hill. Cuando no se obtuvo la inhibición completa, se aplicó la siguiente ecuación:

$$Y = I_{min} + (I_{max} - I_{min}) / (1 + (X/IC_{50})) \dots\dots\dots \text{Ec. 3}$$

Donde I_{min} representa la corriente residual de GABA restante con una concentración máxima del análogo e I_{max} es la corriente obtenida por 3 µM de GABA. IC_{50} es la concentración de antagonista que en presencia de 3µM de GABA da una respuesta a la mitad considerando los límites I_{min} e I_{max} .

Para obtener las diferencias significativas entre grupos se empleó la prueba t de Student para grupos desapareados de dos colas; los niveles de diferencia significativa son p: n.s > 0.05 > * > 0.005 > ** > 0.0008 > *** < 0.0001.

7.4 Acoplamiento molecular.

Se utilizó el modelo por homología del receptor GABA_{A- ρ 1} descrito por Limón (Limon et al., 2016); los ligandos fueron optimizados en términos de carga y conformación estérica a un pH de 7.4 con el software Avogadro (Hanwell, 2012) y el acoplamiento se realizó con Autodock Vina 4.246 (Trott and Olson, 2010), en el cual el ligando tiene libertades en los ángulos de torsión dentro de los límites permisibles. La posible disposición de estas moléculas se limitó al sitio ortostérico para lo cual se construyó una caja virtual con dimensiones 17 x 17 x 12 Å cuyo volumen es suficiente para contener a los 20 residuos de aminoácidos propuestos por Sedelnikova que de manera directa e indirecta afectan al proceso de unión del agonista en el sitio ortostérico (Sedelnikova et al., 2005). Para la visualización de las soluciones y la medición de las distancias se utilizó UCSF Chimera (Pettersen, 2004).

8. RESULTADOS.

GABA, DA, 3-MT, DOPAC, HVA, L-DOPA, 2-PEA, adrenalina, noradrenalina, se aplicaron en concentraciones de 1 mM en ovocitos inyectados y no inyectados con el mRNA de GABA_{A-p1} y solo se encontraron respuestas a GABA en aquellas células inyectadas con el mensajero. Durante el desarrollo de los experimentos se encontró que la mayoría de las respuestas a la misma concentración de GABA mostraron tendencias de incremento o decremento en la amplitud de la corriente, de tal suerte que para realizar las pruebas con los ligandos y determinar su efecto los resultados para ser considerados en los análisis se tuvieron en consideración los siguientes aspectos:

- 1) Para determinar el valor de la inhibición causada por la co-aplicación del análogo/GABA, se consideró el promedio de las corrientes pre y post-aplicación de la mezcla análogo/GABA (Ec. 1).
- 2) Solo se consideraron los valores obtenidos de las células a las que se le pudieran aplicar todas las concentraciones de los análogos.
- 3) Que la amplitud de la corriente obtenida tras la aplicación análogo-GABA no variara en más del 30% respecto de la realizada antes de la co-aplicación.

8.1 Efecto de análogos sobre GABA_{A-p1}.

La L-DOPA, la adrenalina y la noradrenalina fueron evaluadas en concentraciones de hasta 20 mM en co-aplicación con GABA 3 μ M, sin que se encontraran efectos aparentes en las corrientes generadas (datos no mostrados).

Al co-aplicar GABA con la 3-MT, el 2-PEA, el DOPAC y el HVA, las corrientes disminuyeron de manera dependiente de la concentración. Para el caso de la 3-MT la concentración máxima evaluada fue de 10 mM y para el resto de los compuestos se usó una concentración de 20 mM (Figura 8), con lo cual se obtuvo el mayor efecto sobre la corriente. Las curvas concentración-respuesta, generadas a partir de estos datos, estimaron una IC_{50} de $285 \pm 30 \mu\text{M}$, para la 3-MT, y de $1.98 \pm 0.10 \text{ mM}$ para 2-PEA; en ese mismo rango se encontraron los valores para los ácidos, con un valor de $1.97 \pm 0.54 \text{ mM}$ para HVA y de $2.25 \pm 0.26 \text{ mM}$ para DOPAC.

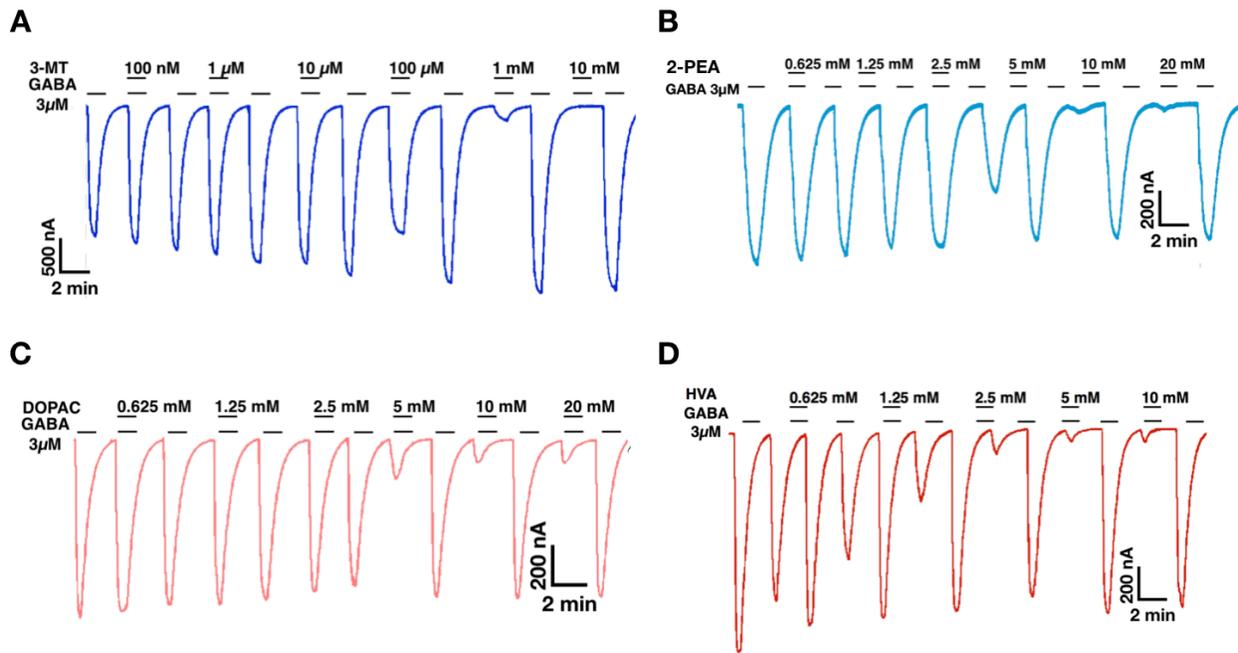


Figura 8. Trazos representativos de corrientes evocadas por GABA 3 μM en ovcitos de *X. laevis* inyectados con GABA_{A-p1}. Inhibición con: **A.** 3-MT. **B.** 2-PEA. **C.** DOPAC. **D.** HVA. Todas las concentraciones fueron evaluadas en 6 ovcitos de al menos 3 ranas diferentes.

Otro dato interesante que arrojó dicho análisis fue la proyección de máxima inhibición, el valor para la 3-MT fue de 99.59 ± 2.17 % y de 97.32 ± 2.73 % para la 2-PEA, en el caso de los ácidos fueron de 93.61 ± 2.41 y 86.53 ± 1.89 % para DOPAC y HVA respectivamente. Los ácidos mostraron una diferencia con el 100% de nivel significativo ($p > 0.05$, Figura 9).

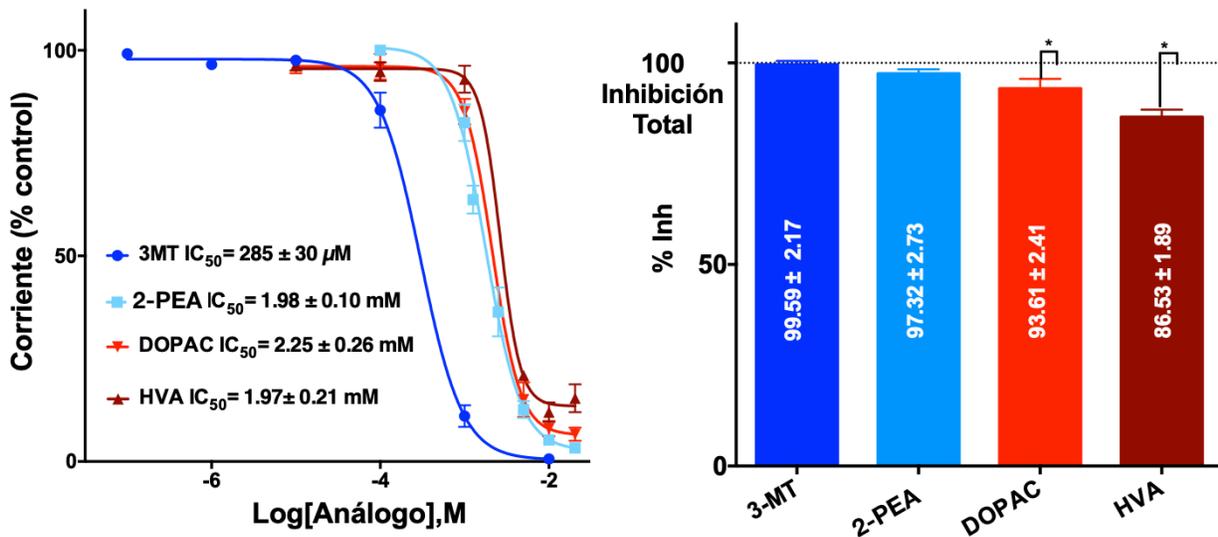


Figura 9. Relación concentración-respuesta y efecto máximo.
A. Curvas concentración-respuesta para los análogos evaluados; los valores estimados para la IC₅₀ se encuentran en el gráfico. **B.** Estimación de la inhibición máxima para cada análogo, valores dentro de las barras; * diferencia significativa, en los casos de DOPAC ($p = 0.045$) y HVA ($p = 0.0008$).

8.2 Sitio de unión.

8.2.1 Poro del canal.

Considerando que las moléculas fueron evaluadas a un pH= 7.4, se puede asumir que estas se encontraban preferentemente en su forma ionizada ($pK_a = 9.64, 9.83, 4.42, 4.39$, para la 3-MT, el 2-PEA, el DOPAC y el HVA respectivamente), por tanto se realizaron ensayos para medir el efecto del voltaje en la inhibición; para ello se diseñó

un protocolo con variación de voltaje en forma de rampa de -120 a +70 mV, con una duración de 2 s. Los análogos fueron co-aplicados a una concentración equivalente a sus respectivas IC_{50} , en presencia de 3 μM de GABA; las corrientes fueron normalizadas en función de la amplitud registrada en el potencial más negativo (-120 mV, Figura 10 A); y se compararon los valores de inhibición a voltajes específicos (-120, -60, +30 y +70 mV, Figura 10 B). Los datos obtenidos muestran pequeñas diferencias en los niveles de inhibición, las cuales no son de nivel significativo ($p > 0.05$), lo que sugiere que la formación del complejo ligando-receptor-modulador no es sensible al voltaje e igualmente sugiere que el mecanismo de inhibición para estas moléculas no es a través del bloqueo del poro.

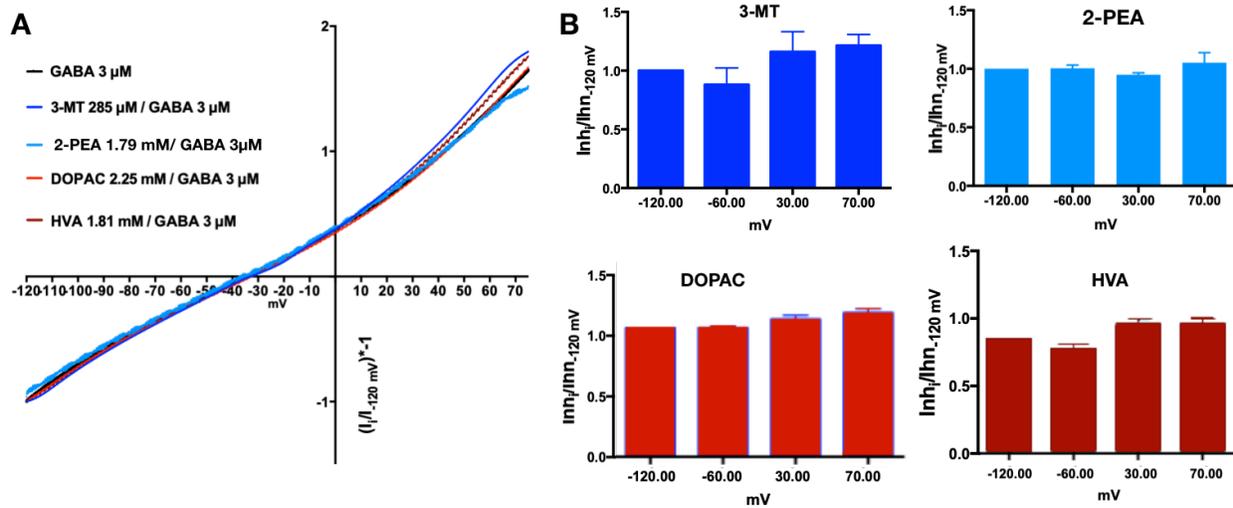


Figura 10. Efecto del Voltaje en la inhibición por análogos.

A. Los perfiles de corriente, en función de la rampa de voltaje, fueron similares. **B.** La inhibición determinada en voltajes particulares para los análogos no muestra diferencias significativas.

8.2.2 Sitio ortostérico.

Otro de los posibles sitios de unión del ligando es el que ocupa el propio agonista, razón por la cual se realizaron ensayos en donde se evaluó la capacidad del GABA para activar al receptor $GABA_{A-\rho 1}$ en presencia de diferentes concentraciones de los moduladores negativos. Estos ensayos se realizaron con tres concentraciones diferentes las cuales representan las IC_{25} , IC_{50} e IC_{75} , para la 3-MT, la 2-PEA y el DOPAC.

Los resultados para los tres análogos muestran un desplazamiento a la derecha lo que implica un incremento en la EC_{50} de GABA; en el caso de la co-aplicación con 3-MT, los valores del GABA fueron de 2.68 ± 0.4 ; 3.50 ± 0.74 y $8.09 \pm 0.65 \mu M$, para las concentraciones de 3-MT de IC_{25} , IC_{50} e IC_{75} , respectivamente, los cuales al ser comparados con la EC_{50} , de GABA ($2.27 \pm 0.40 \mu M$), solo los valores obtenidos en presencia de 3-MT (IC_{50} e IC_{75}), tienen una diferencia significativa (Figura 11).

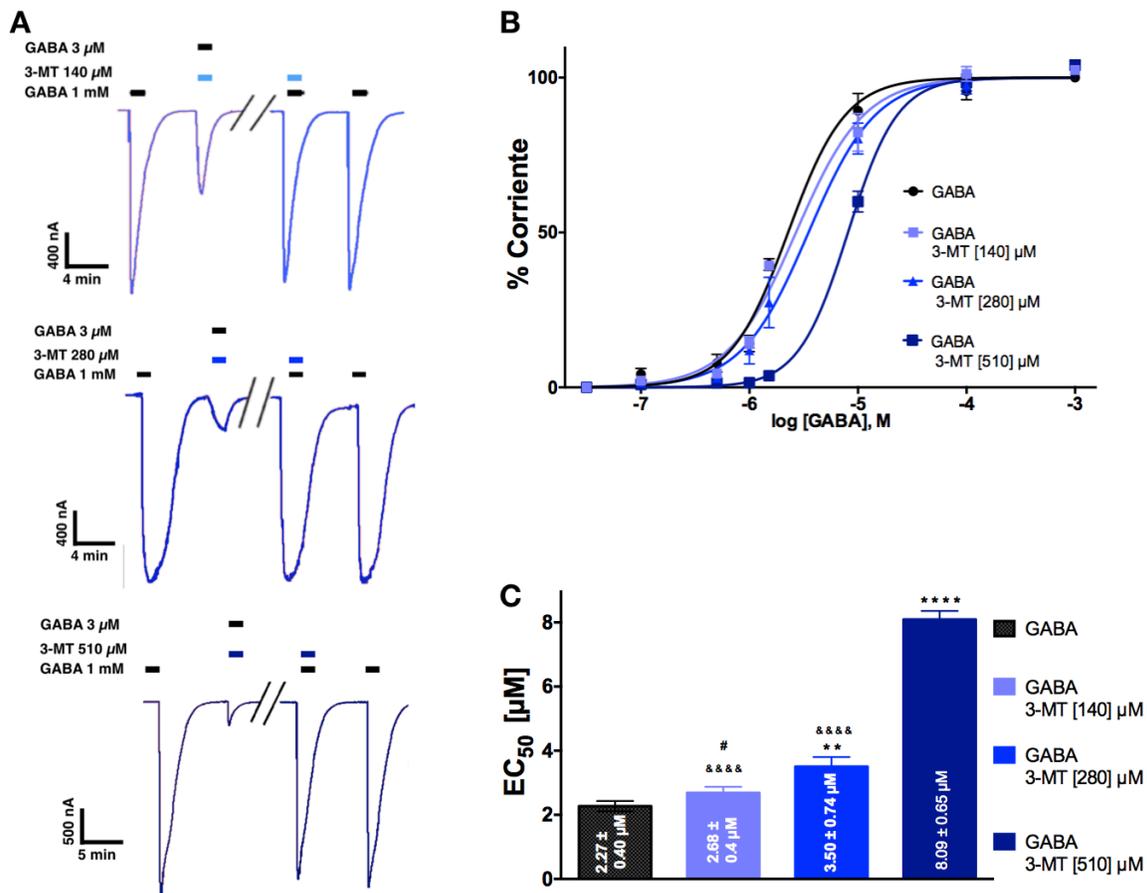


Figura 11. Ensayos de competencia entre GABA y 3-MT.

A. Corrientes generadas por GABA (1 mM máxima concentración evaluada) con 3-MT a una concentración de 140, 280 y 510 μM (IC_{25} IC_{50} IC_{75} respectivamente), en los tres casos el efecto de la 3-MT se ve abatido por completo. **B.** Curvas concentración-respuestas. La corriente se normalizó en función de la corriente de GABA a 1mM, se observa un desplazamiento a la derecha y todas alcanzan el máximo de corriente. **C.** Valor de la EC_{50} para el GABA, en presencia de diferentes concentraciones de 3-MT (los valores de la EC_{50} se encuentran dentro de la correspondiente barra), diferencias significativas, #=0.0495 diferencia significativa GABA solo versus mezcla (GABA/3-MT IC_{25}) * Diferencia significativa mezcla GABA/ 3-MT versus GABA solo, ** 0.0076 (GABA/ 3-MT IC_{50}), ****<0.0001 (GABA/ 3-MT IC_{75}); &diferencia significativa para la mezcla GABA/3-MT versus GABA/3-MT IC_{75} &&&&<0.0001 (GABA/3-MT IC_{50}); 0.0001 (GABA/3-MT IC_{25}). Todos los puntos fueron evaluados en 6 células de al menos 2 ranas.

La 2-PEA modificó la EC_{50} , de GABA de $2.27 \pm 0.40 \mu\text{M}$ a 2.87 ± 0.34 , 3.50 ± 0.50 y $6.40 \pm 0.86 \mu\text{M}$, con 2-PEA IC_{25} , IC_{50} e IC_{75} respectivamente, siendo todos los valores significativamente diferentes a la EC_{50} de GABA solo (Figura 12).

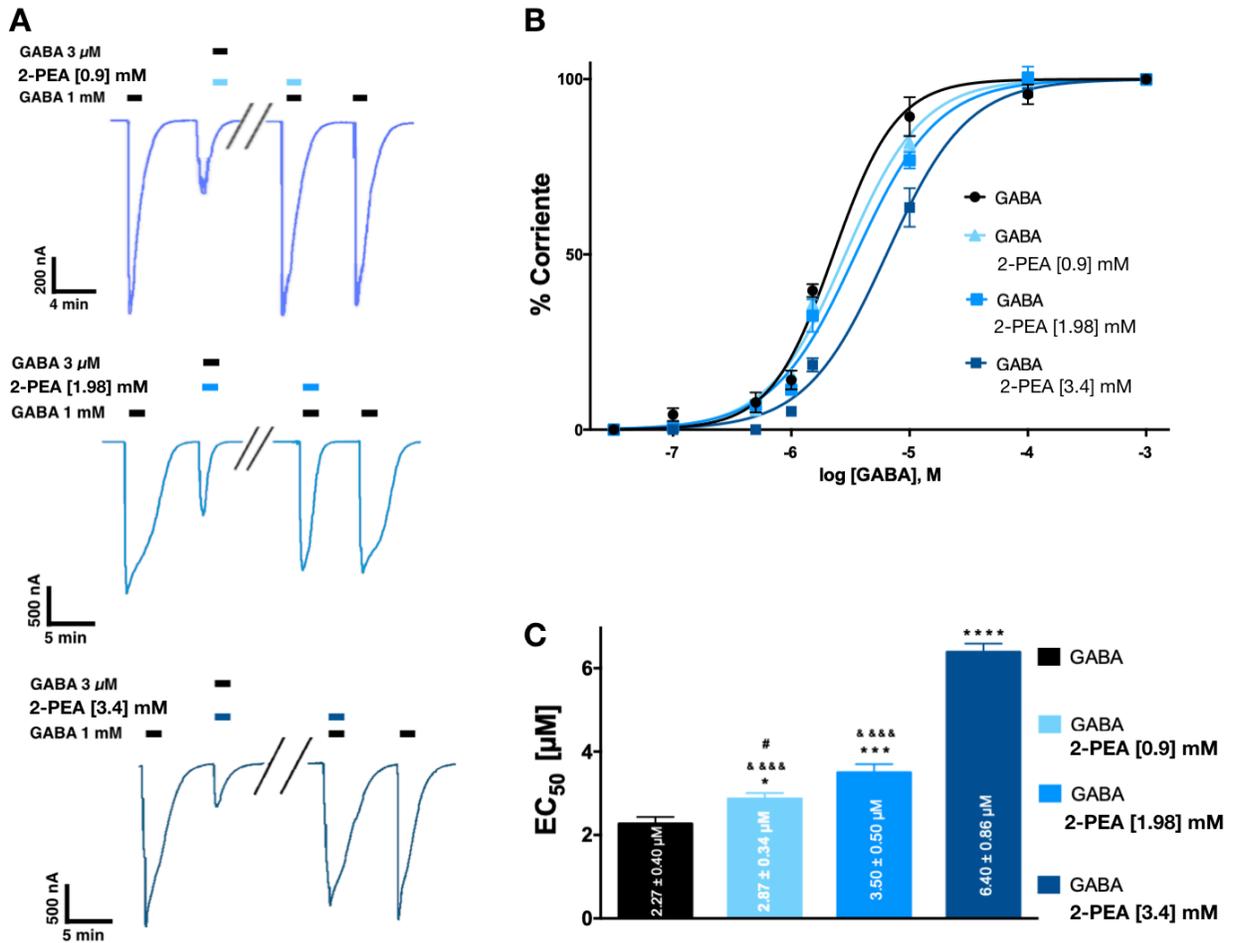


Figura 12. Ensayos de competencia entre GABA y 2-PEA.

A. Corrientes generadas por GABA (1 mM máxima concentración evaluada) con 2-PEA a una concentración de 0.9, 1.7 y 3.4 mM (valores de IC_{25} IC_{50} IC_{75} respectivamente); en los tres casos el efecto del 2-PEA se ve abatido por completo. **B.** Curvas concentración-respuestas, la corriente se normalizó en función de la corriente de GABA a 1m; se observa un desplazamiento de manera paralela a la derecha y todas alcanzan el máximo de corriente. **C.** Valor de la EC_{50} para el GABA, en presencia de una determinada concentración de 2-PEA (los valores de la EC_{50} se encuentran dentro de la correspondiente barra); diferencias significativas respecto de GABA solo, $*=0.02$ (GABA/2-PEA $_{IC_{25}}$) $***=0.009$ (GABA/2-PEA $_{IC_{50}}$), $***=0.0009$ (GABA/2-PEA $_{IC_{75}}$), $\#= 0.032$ (GABA/2-PEA $_{IC_{25}}$ vs (GABA/2-PEA $_{IC_{50}}$), $\&\&\& < 0.0001$ (GABA/2-PEA $_{IC_{75}}$) vs (GABA/2-PEA $_{IC_{25}}$) y (GABA/2-PEA $_{IC_{50}}$).

EL DOPAC incrementó la EC_{50} de GABA, a 4.39 ± 0.39 , 4.65 ± 0.46 y 5.34 ± 0.52 μM al ser aplicado a la IC_{25} , IC_{50} e IC_{75} , respectivamente. Al igual que la 2-PEA, los tres valores son significativamente diferentes al valor basal para el GABA (Figura 13).

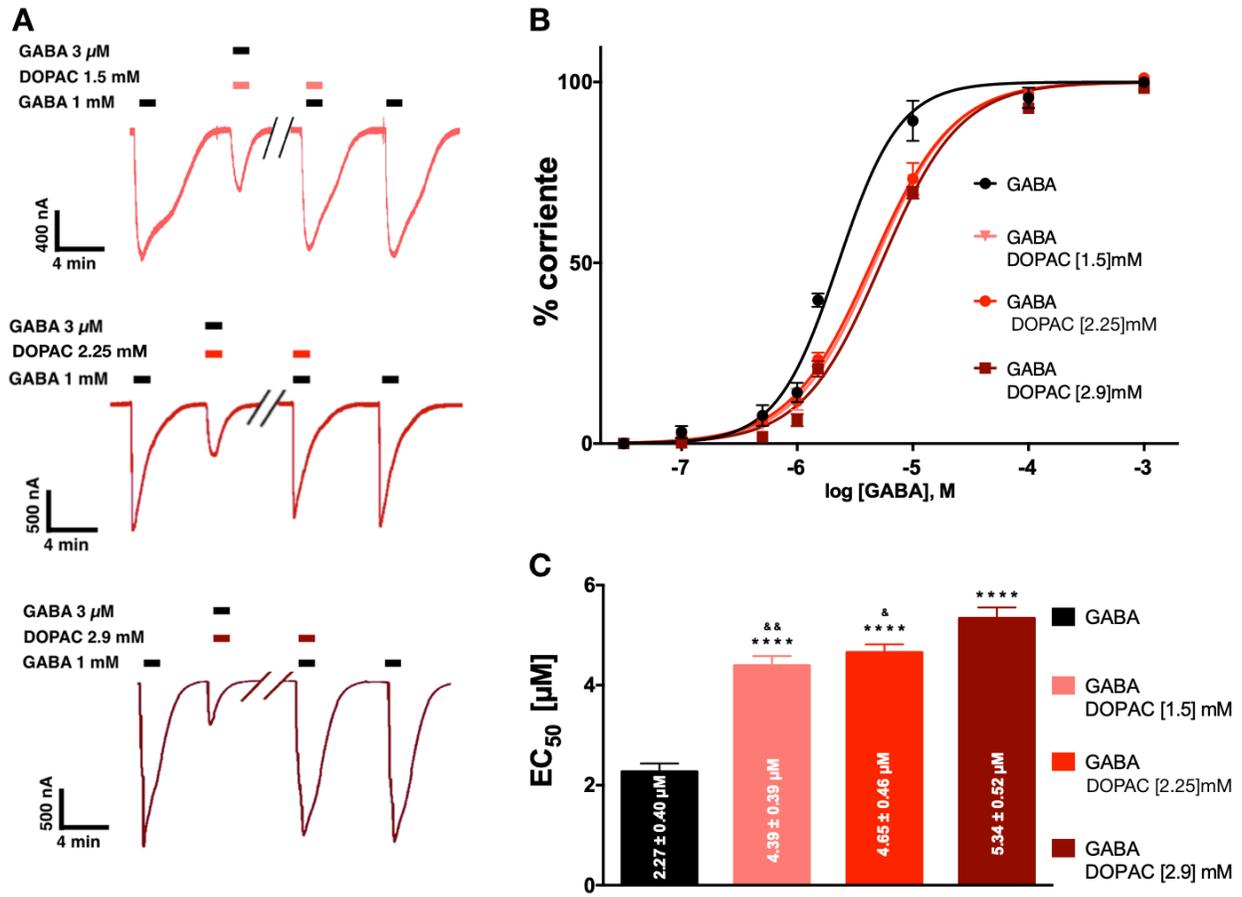


Figura 13. Ensayos de competencia entre GABA y DOPAC.

A. Corrientes generadas por GABA (1 mM máxima concentración evaluada) con DOPAC a una concentración de 1.5, 2.1 y 2.9 mM (valores de IC_{25} , IC_{50} e IC_{75} , respectivamente); en los tres casos el efecto del DOPAC se ve abatido por completo. **B.** Curvas concentración-respuestas. La corriente se normalizó en función de la corriente de GABA a 1 mM; se observa un desplazamiento de manera paralela a la derecha y todas alcanzan el máximo de corriente. **C.** Valor de la EC_{50} para el GABA, en presencia de una determinada concentración de DOPAC (los valores de la EC_{50} se encuentran dentro de la correspondiente barra); diferencias significativas, respecto de GABA solo, $**** < 0.0001$ (GABA/DOPAC $_{IC_{25}}$, 50 y 75), $\& = 0.0076$ ((GABA/DOPAC $_{IC_{50}}$) vs (GABA/DOPAC $_{IC_{75}}$)), $\&\& = 0.001$ (GABA/DOPAC $_{IC_{25}}$) vs (GABA/DOPAC $_{IC_{75}}$).

8.3 Acoplamiento virtual (docking).

8.3.1 Análogo en el sitio ortostérico.

Los resultados de los ensayos de competencia mostraron que la 3-MT, el DOPAC y la 2-PEA comparten el sitio de unión con el GABA. En el “docking” (se incluyó al HVA), los resultados mostraron un patrón similar, el cual es perpendicular al plano que se establece entre el GABA y los 4 residuos con los que establece interacciones: arginina¹⁰⁴, serina¹⁶⁸, tirosina¹⁹⁸ y treonina²⁴⁴. En el caso de los antagonistas evaluados es la región del amino o del ácido la que se ubica en el mismo plano del GABA; por su parte la región del anillo de benceno apunta hacia el dominio transmembranal (Figura 14).

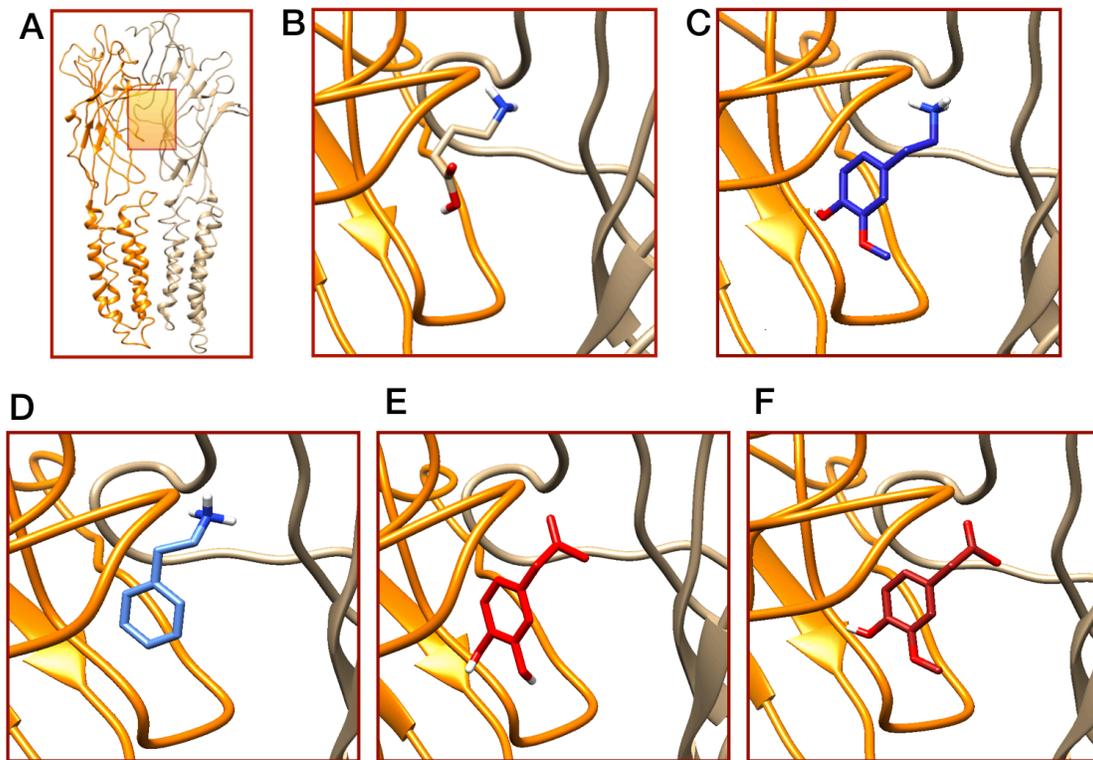


Figura 14. Disposición general de los ligandos en el sitio ortostérico.

A. Esquema de la interfaz en que se forma el sitio de unión del GABA. **B.** Disposición general del GABA. **C, D, E y F.** Disposición general del ligando en el sitio ortostérico, en paralelo a los pases transmembranales (perpendicular a la membrana). **C.** 3-MT, **D.** 2-PEA, **E.** DOPAC y **F.** HVA.

La región aromática de los ligandos queda entre las tirosinas 102 y 241, por lo que se establece una formación tipo “sándwich” o de apilamiento, con ligeras variaciones en las orientaciones de las moléculas respecto a los residuos. Las distancias estimadas desde los carbonos de la posición 1 del benceno tanto del ligando como de los residuos, son 4.93, 5.14, 4.83 y 4.93 Å para la tirosina²⁴¹, con 3-MT, 2-PEA, DOPAC y HVA, respectivamente; en el mismo orden las distancias con la tirosina¹⁰², resultaron de 4.62, 4.95, 4.76 y 4.66 Å (Figura 15).

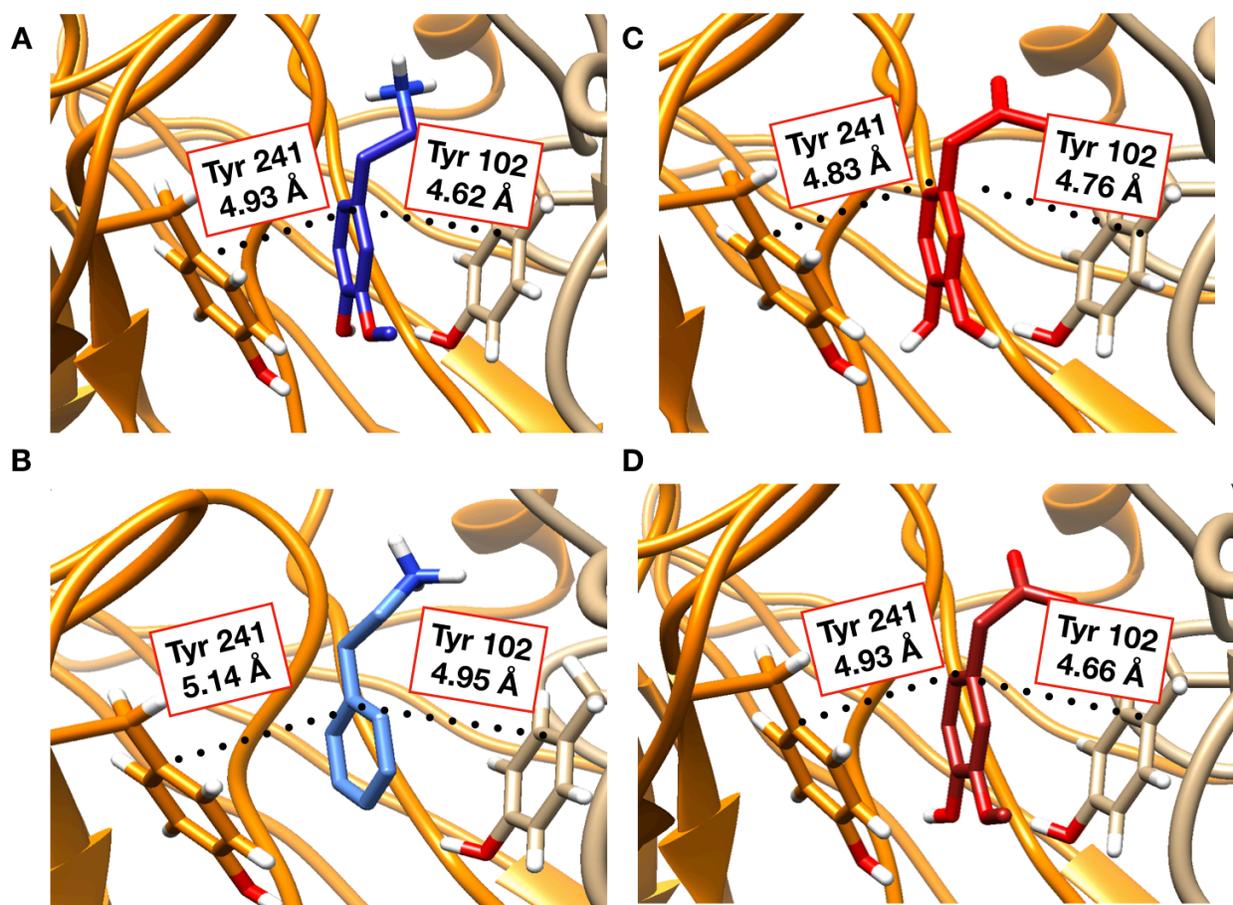


Figura 15. Disposición del fenilo de los ligandos, en conformación tipo sándwich o apilamiento. En cada caso, el fenilo de cada ligando, mantuvo una disposición semejante entre los fenoles de las tirosinas; las distancias determinadas van del carbono 1 de fenilo hacia el respectivo carbono 1 del fenol; el primer valor es respecto al residuo 241 y el segundo es respecto al 102 **A.** 3-MT, 4.93 y 4.62 Å **B.** 2-PEA, 5.14 y 4.95 Å, **C.** DOPAC, 4.83 y 4.76 Å, y **D.** HVA, 4.93 y 4.66 Å.

En esa orientación se observó a un residuo de ácido glutámico cercano a los ligandos; las distancias de un oxígeno del grupo carboxilo de su cadena lateral al oxígeno del grupo hidroxilo de la posición 4 de los ligandos (excepto la 2-PEA, la cual carece de éste), son de 2.81, 2.82 y 1.98 Å respectivamente, para 3-MT, DOPAC y HVA (Figura 16).

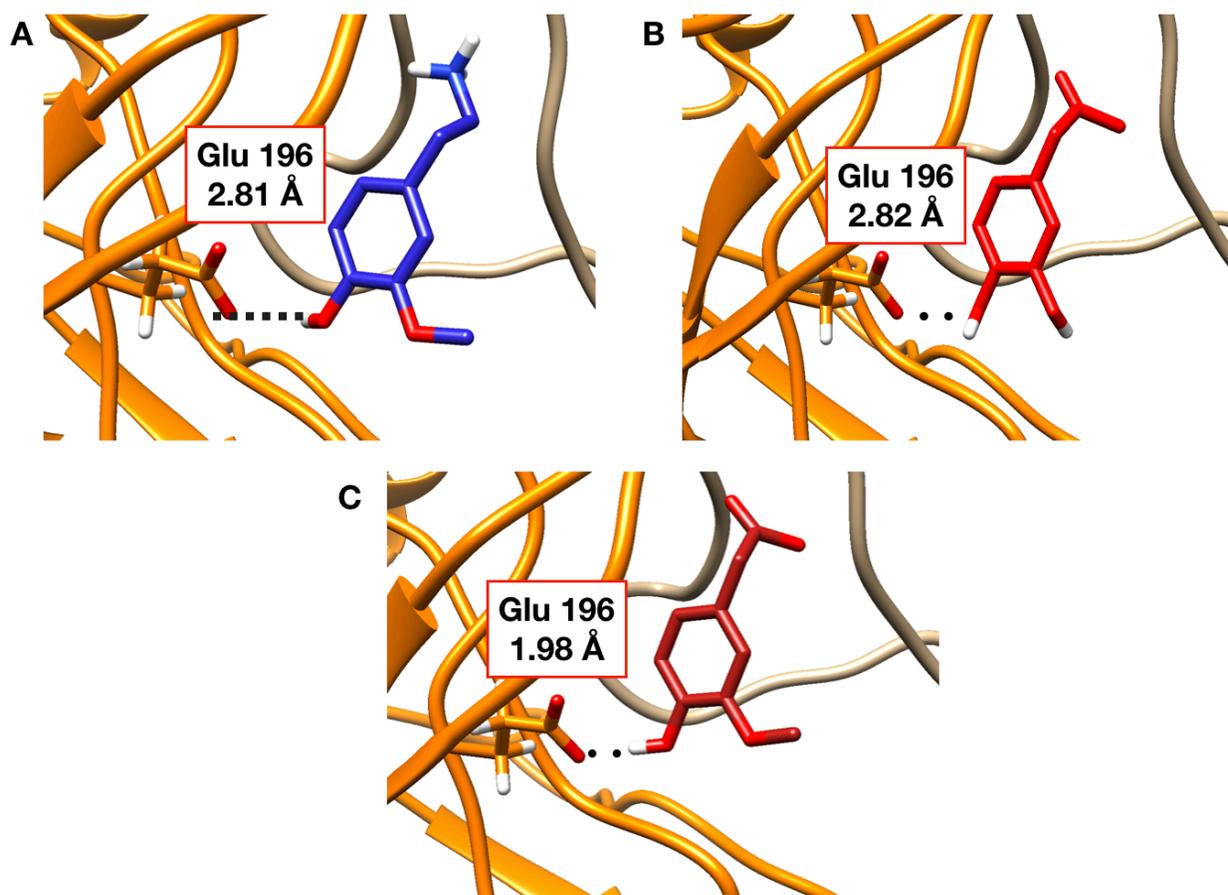


Figura 16. Distancia del hidroxilo posición 4, con glutamato 196.

Determinación de la distancia entre el residuo glutamato 196 y el hidroxilo de la posición 4 del ligando; la menor distancia se observa con el HVA, **A.** 3-MT, a una distancia de 2.81 Å, **B.** DOPAC a una distancia de 2.82 Å, **C.** HVA a una distancia de 1.98 Å.

Considerando a los cuatro residuos con mayor influencia en el proceso de anclaje e inicio de la apertura del canal (serina¹⁶⁸, tirosina¹⁹⁸, arginina¹⁰⁴ y treonina²⁴⁴) con respecto a los residuos encargados del anclaje (serina¹⁶⁸ y tirosina¹⁹⁸), el grupo amino de los ligandos que lo contienen (3-MT y 2-PEA) se localiza a una menor distancia de la tirosina¹⁹⁸, (3.06 Å y 3.06 Å), seguido de la serina¹⁶⁸ a una distancia de 4.17 y 3.78 Å; en tercer orden fue la arginina¹⁰⁴ a 4.45 y 4.63 Å y el más lejano fue la treonina²⁴⁴ a 5.38 y 4.81 Å para la 3-MT y la 2-PEA respectivamente (Figura 17 A, B).

Los ligandos con un grupo ácido (DOPAC y HVA) mostraron un patrón diferente, coincidiendo solo en la treonina²⁴⁴, como el residuo más distante ubicado a 5.23 y 5.14 Å del DOPAC y HVA, respectivamente; de la misma manera ambos ligandos tienen en la serina¹⁶⁸, al tercer residuo más distante, a 3.90 y 3.94 Å; sin embargo, el orden de los más cercanos fue inverso, pues para el DOPAC, el más cercano fue la arginina¹⁰⁴ a 3.00 Å y la tirosina¹⁹⁸ a 3.08 Å; en el caso del HVA, se ubicó a 2.31 Å de la tirosina¹⁹⁸ y a 3.31 Å de la arginina¹⁰⁴ (Figura 17 C, D).

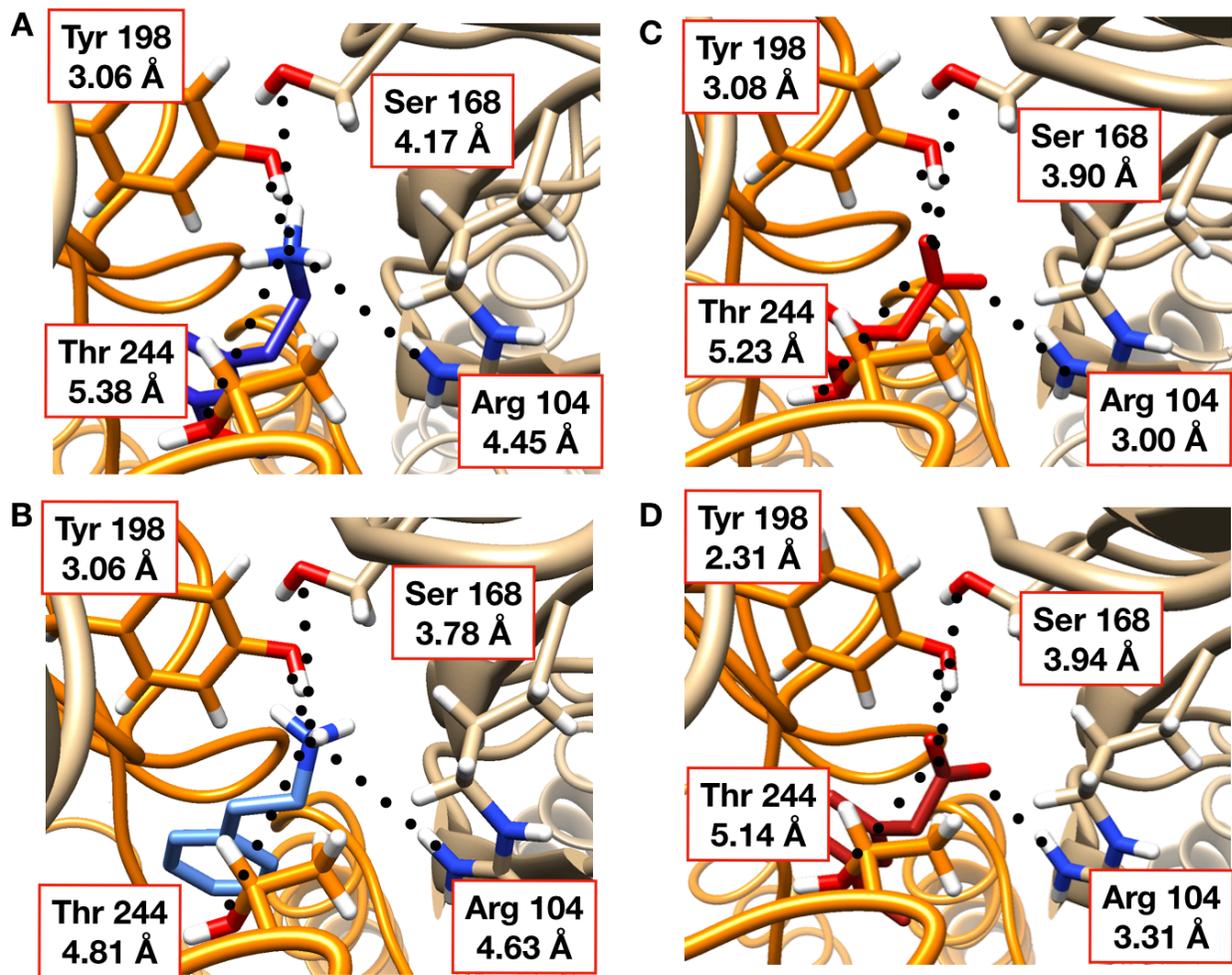


Figura 17. Distancias de los grupos amino o ácido, con Tyr 198, Ser 168, Thr 244 y Arg 104.

El orden de distancia entre el grupo amino y los residuos mostró el mismo patrón, en orden ascendente, Tyr¹⁹⁸, Ser¹⁶⁸, Arg¹⁰⁴ y Thr²⁴⁴, en **A.** 3-MT, y **B.** 2-PEA. Para los ácidos el patrón fue para el tercer y cuarto residuos más cercanos (Ser¹⁶⁸ y Thr²⁴⁴, respectivamente); sin embargo, en **C.** DOPAC el residuo más cercano fue Arg¹⁰⁴ y el segundo Tyr¹⁹⁸, mientras que para **D.** HVA el residuo más cercano fue la Tyr¹⁹⁸, y segundo la Arg¹⁰⁴.

8.3.2 Arreglo espacial del análogo.

La forma en que el ligando se acopla al sitio de unión se rige por el principio de mínima energía, dicho principio se aplica al complejo ligando-receptor. La plataforma Autodock Vina permite analizar la formación de los complejos considerando cambios en la orientación de los sustituyentes del ligando. Por tanto, en el modelo de acoplamiento es posible que el arreglo espacial de los sustituyentes del ligando no sea el más favorable en términos energéticos, ya que como se mencionó el principio de mínima energía se aplica al complejo y no de manera aislada al ligando.

Para cuantificar las variaciones en las orientaciones espaciales de los sustituyentes, se determinaron los ángulos diedros en el modelo optimizado de los ligandos (estimado en Avogrado, considerando el pH de 7.4) para contrastarlos con la conformación final del ligando en el modelo de acoplamiento (Autodock Vina). En la presente investigación se determinaron los ángulos conformados entre la región aromática y los diferentes sustituyentes, considerando en el caso de los hidroxilos o metoxilo el plano generado por ese enlace; en el caso de la amina se establecieron planos adicionales, el primero de ellos conformado por los carbonos del etilo y el segundo en donde el primero de los planos se establece entre el carbono 1 del fenilo y el 1 del etilo, y el segundo plano es el conformado entre el carbono 2 del etilo y el nitrógeno de la amina. En caso del ácido carboxílico el primer ángulo fue considerando el plano del fenilo y el plano conformado por el carbono del metilo y el carbono del ácido carboxílico; adicionalmente se determinó un segundo ángulo considerando este último plano y el formado por los oxígenos del ácido.

En el caso de la 2-PEA, en el modelo optimizado, el ángulo conformado entre el plano del fenilo y los carbonos del etilo es de 90.001° , el segundo es de 91.093° (plano del nitrógeno); para el acoplamiento los valores fueron de 10.417° (Figura 18 A) para el primero y de 131.039° para el segundo (Figura 18 B), es decir la diferencia absoluta en los ángulos fue de 79.59° y 39.94° respectivamente.

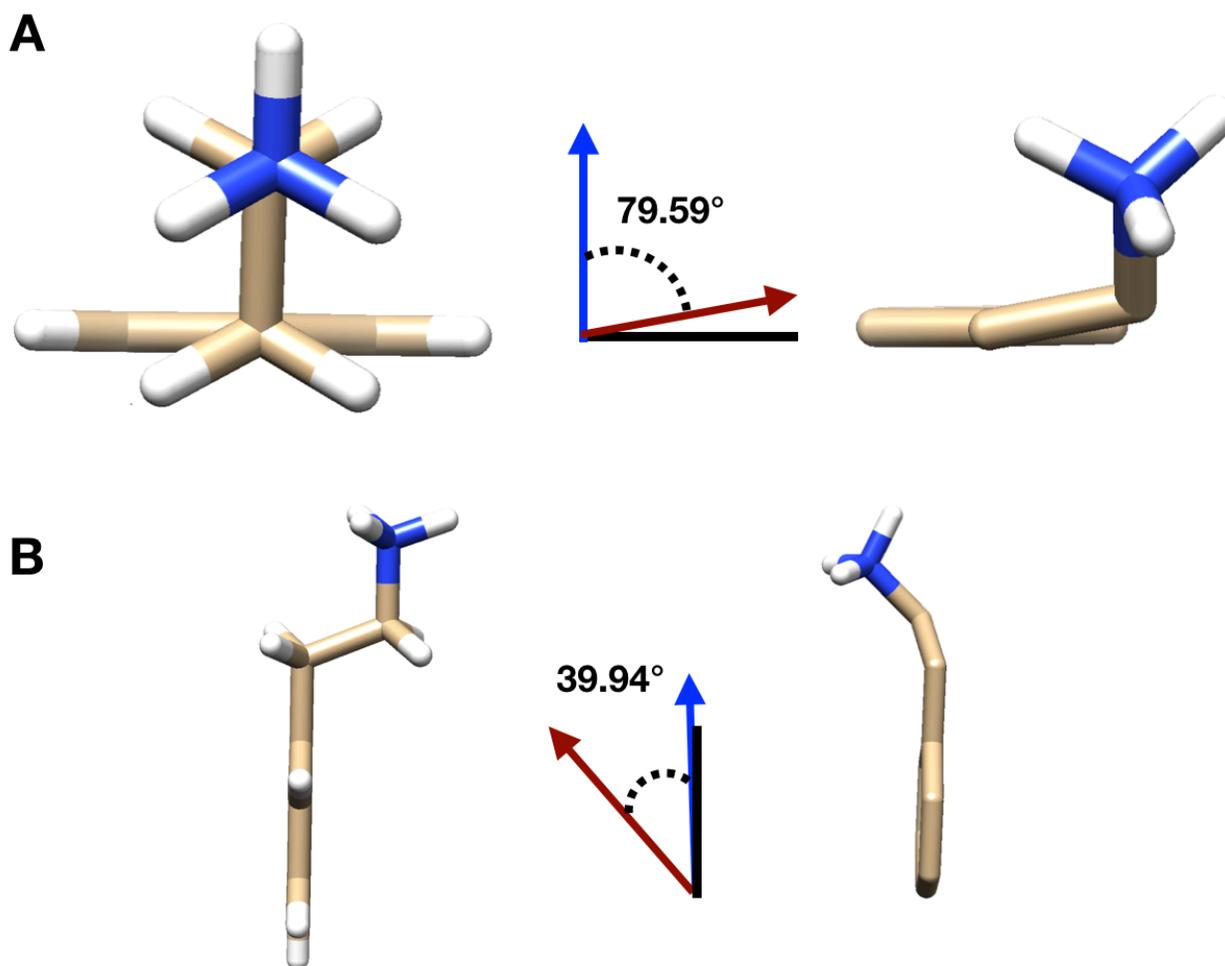


Figura 18. Cambios en los ángulos diedrales de 2-PEA.

A. Cambios en los ángulos diedros, considerando como base al fenilo (barra negra), para el etilo (flechas azul y guinda); izquierda modelo optimizado (flecha azul), derecha modelo en acoplamiento (flecha guinda), se muestra el valor absoluto en grados del cambio en la posición del sustituyente. **B.** Cambios en los ángulos diedros, considerando como base al etilo (barra negra), para el plano carbono-nitrógeno (flechas azul y guinda) izquierda modelo optimizado (flecha azul); derecha modelo en acoplamiento (flecha guinda); en medio se muestra el valor absoluto en grados del cambio en la posición del sustituyente.

En el caso de la 3-MT en el modelo optimizado, el ángulo con el hidroxilo de la posición 4, es de 179.91° y el de la posición 3, es de 90.009° ; en la región de la amina el ángulo con el plano del fenilo es de 89.925° y el formado por el etilo y la amina es de 1.1210° . En el modelo de acoplamiento los ángulos formados son de 32.457° , 173.92° , 102.02° y 24.521° en mismo orden que el descrito para el modelo optimizado (Figura 19 A, B, C respectivamente), en la Figura 19 de muestran los valores absolutos de los cambios de los ángulos.

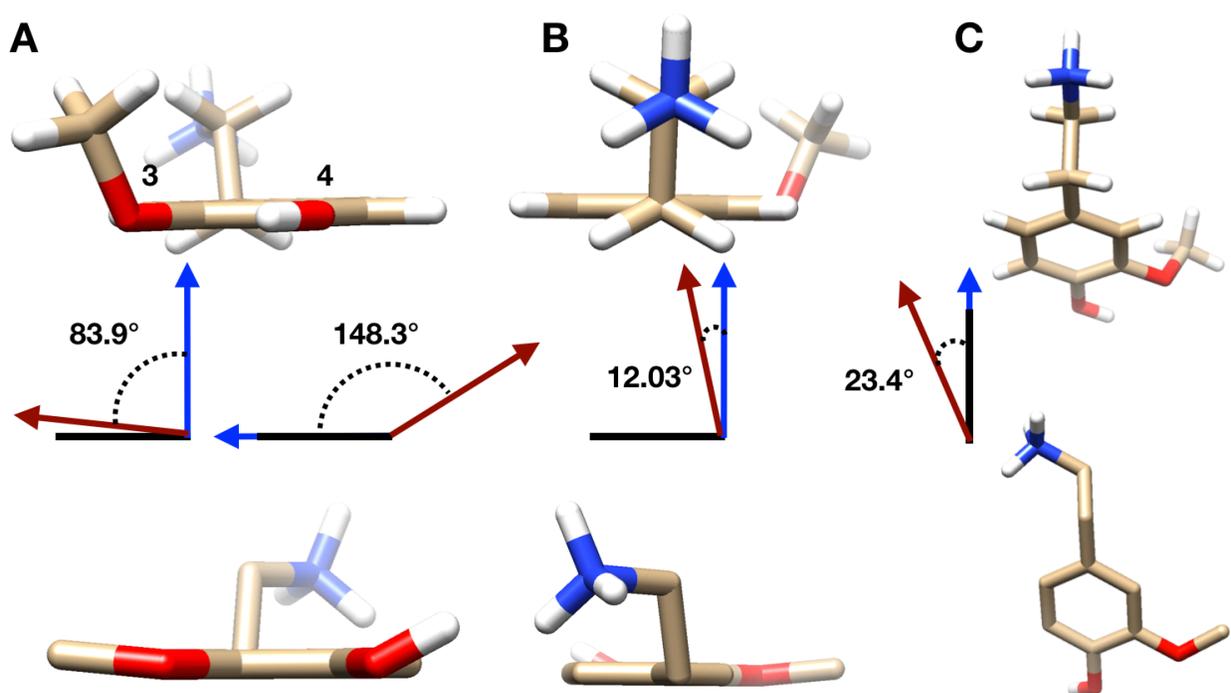


Figura 19. Cambios en los ángulos diedros de 3-MT.

A. Cambios en los ángulos diedros considerando como base al fenilo (barra negra), para el metoxilo (3) y el hidroxilo (4); arriba modelo optimizado; abajo, modelo en acoplamiento; en medio izquierda, metoxilo (3) (flechas azul y guinda) y en medio derecha, hidroxilo (4) (flechas azul y guinda); se muestran los valores absolutos en grados del cambio en la posición del sustituyente. **B.** Cambios en los ángulos diedros considerando como base al fenilo (barra negra) para el etilo; arriba modelo optimizado (flecha azul), abajo modelo en acoplamiento (flecha guinda), **C.** Cambios en los ángulos diedros considerando como base al etilo (barra negra), para el plano carbono-nitrógeno; arriba modelo optimizado (flecha azul); abajo, modelo en acoplamiento (flecha guinda). En todos los casos se muestran en medio los valores absolutos en grados del cambio en la posición del sustituyente.

Para el DOPAC el ángulo del hidroxilo 4 es de 180.3° , el de la posición 3 es de 0.103° , el del ácido carboxílico con el fenilo es de 90.021° y el de los oxígenos es de 0.021° ; en el mismo orden se mencionan los ángulos encontrados en la estructura acoplada al receptor, 55.584° , 245.512° , 110.859° y 89.98° (Figura 20 A, B, C respectivamente, se incluyen los valores absolutos de los cambios de los ángulos).

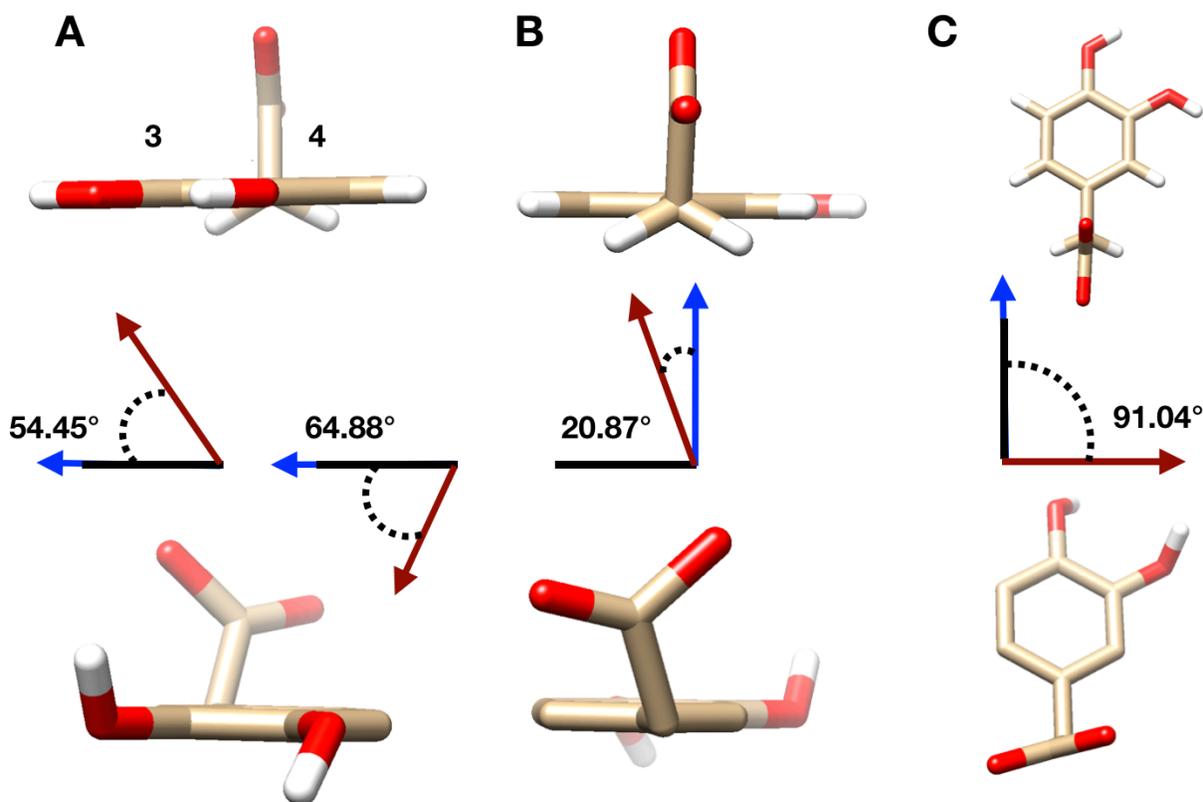


Figura 20. Cambios en los ángulos diedros de DOPAC.

A. Cambios en los ángulos diedros considerando como base al fenilo (barra negra), para los hidroxilos (3, 4); arriba, modelo optimizado; abajo, modelo en acoplamiento en medio izquierda, hidroxilo (3) (flechas azul y guinda) y en medio derecha, hidroxilo (4) (flechas azul y guinda). **B.** Cambios en los ángulos diedros considerando como base al fenilo (barra negra), para el carbono-carbonilo; arriba modelo optimizado (flecha azul); abajo modelo en acoplamiento (flecha guinda). **C.** Cambios en los ángulos diedros considerando como base el plano carbono-carbonilo, (barra negra), para el plano conformado por los oxígenos del carbonilo; arriba modelo optimizado (flecha azul); abajo modelo acoplado (flecha guinda). En todos los casos se muestran los valores absolutos en grados del cambio en la posición del sustituyente.

En el HVA los ángulos en el modelo optimizado fueron de 179.98° para la posición 4, 90.072° para la posición 3, 90.335 para el fenilo con el ácido carboxílico, y 0.146° para el plano de los oxígenos; los ángulos para el ligando (HVA en el receptor), fueron de 337.64° , 176.634° , 115.45° y 89.856° , en la Figura 21 se muestran los cambios en las orientaciones así como la diferencia en valores absolutos de los ángulos.

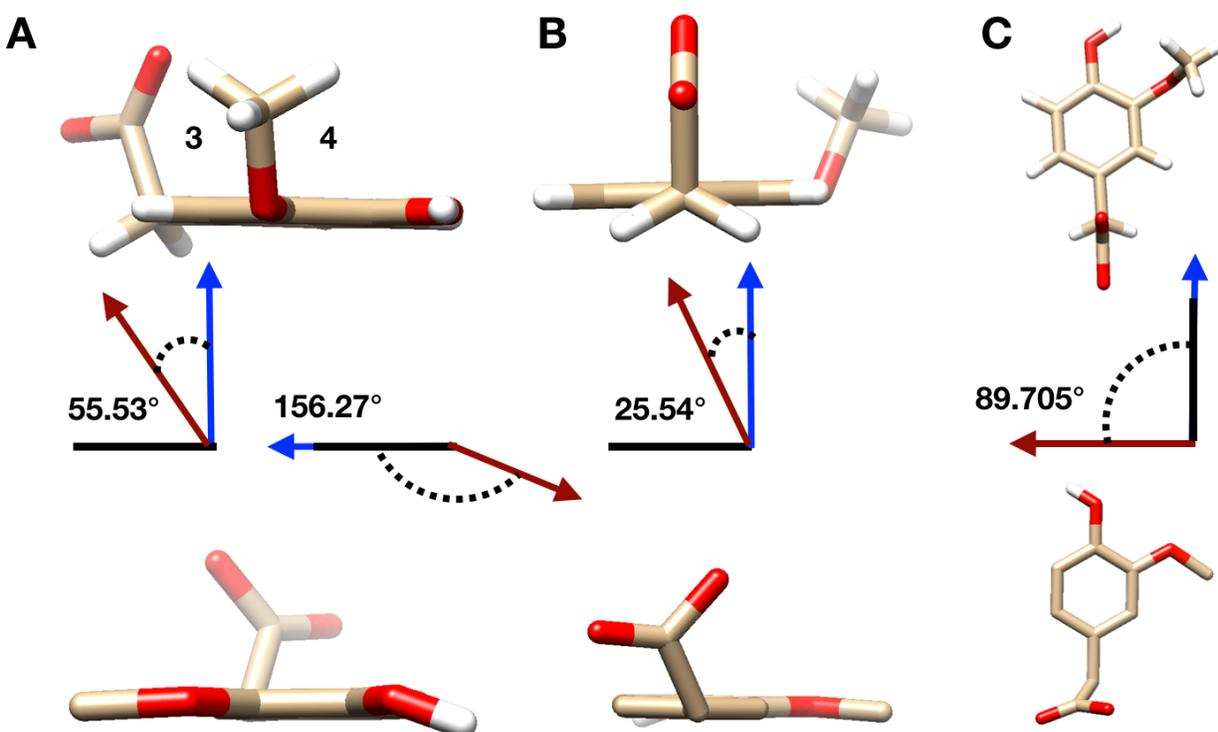


Figura 21. Cambios en los ángulos diedros de HVA.

A. Cambios en los ángulos diedros considerando como base al fenilo (barra negra), para el carboxilo (3) y el hidroxilo (4); arriba, modelo optimizado; abajo, modelo en acoplamiento; en medio derecha, hidroxilo (4) (flechas azul y guinda); en medio izquierda, carboxilo (3) (flechas azul y guinda). **B.** Cambios en los ángulos diedros considerando como base al fenilo (barra negra), para el carbono-carbonilo; arriba modelo optimizado; abajo modelo en acoplamiento. **C.** Cambios en los ángulos diedros considerando como base el plano carbono-carbonilo (barra negra) para el plano conformado por los oxígenos del carbonilo; arriba modelo optimizado (flecha azul), abajo modelo acoplado (flecha guinda). En todos los casos se muestran los valores absolutos en grados del cambio en la posición del sustituyente.

Una de las repercusiones más evidentes en los cambios de dichos ángulos, es el cambio en la distancia entre los sustituyentes; en el caso de la 2-PEA, la distancia del carbono (carbono 1 del fenilo) al nitrógeno de la amina pasó de 3.799 a 3.627 Å (Figura 22 A); en el caso de la 3-MT la distancia entre el carbono de la posición 3 al nitrógeno de la amina fue de 6.865 Å; en caso del hidrógeno del sustituyente de la posición 4 al mismo nitrógeno fue de 8.310 Å; estas distancias se modificaron a 7.126 y 7.505 Å respectivamente (Figura 22 B), los porcentajes de cambio (absoluto), para ambos análogos se mencionan en la Figura 22 C.

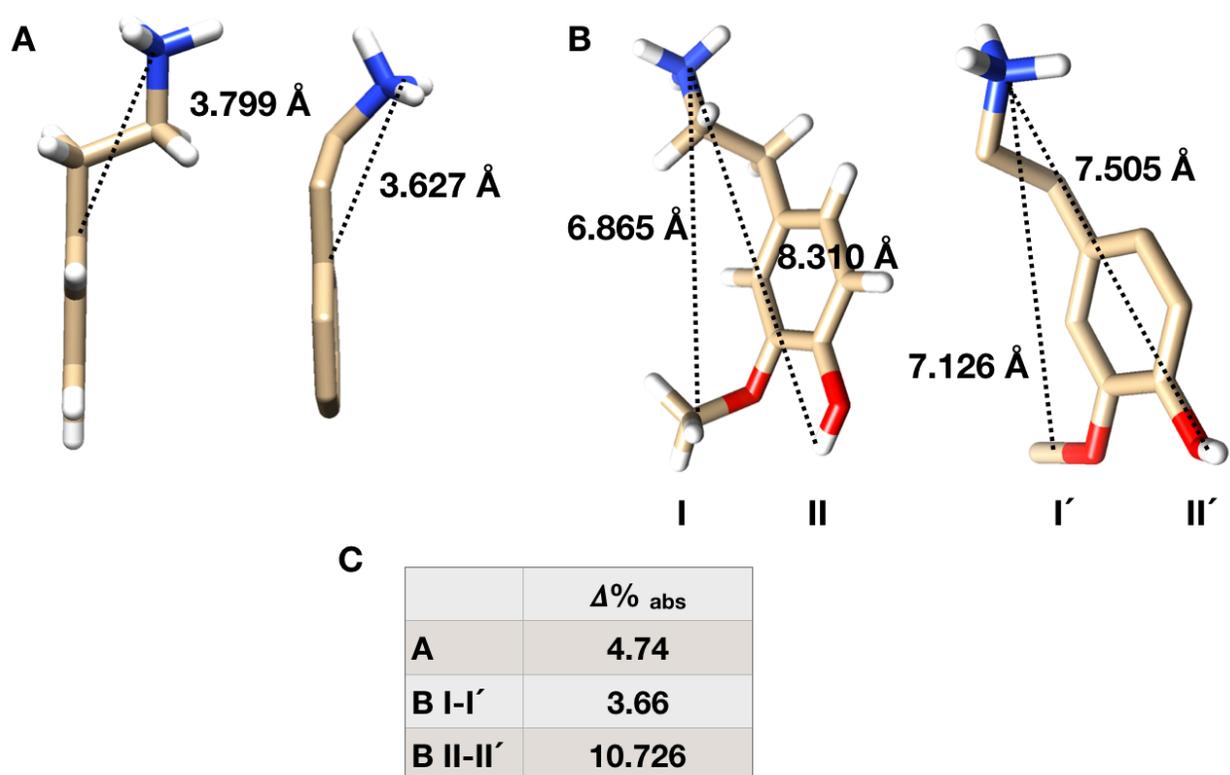


Figura 22. Modificación de distancias en los ligandos, aminas-C1 de anillo de 2-PEA y aminas-hidrógenos hidroxílicos.

A. 2-PEA, Izquierda modelo optimizado, derecha modelo en acoplamiento. **B.** 3-MT, Izquierda modelo optimizado, derecha modelo en acoplamiento. **C.** Porcentajes de cambio, en valores absolutos.

La distancia del DOPAC desde el hidrógeno del sustituyente de la posición 3 al primer de los oxígenos del ácido carboxílico fue de 5.473 Å; la distancia al segundo oxígeno fue de 6.734 Å. En el caso del hidrógeno de la posición 4 a los mismos oxígenos fueron de 6.599 y 8.237 Å; las distancias se modificaron en el modelo acoplado quedando en 7.216, 5.982, 7.344 y 7.743 Å en el mismo orden. En el HVA las distancias en el modelo optimizado las distancias fueron partiendo del carbono del metoxilo de la posición 3 al nitrógeno fue de 5.566 Å, al otro oxígeno la distancia fue de 7.207 Å, en el caso del sustituyente de la posición 4 (hidrógeno), a estos oxígenos fue de 6.630 y 8.232 Å, en el modelo acoplado las distancias se modificaron quedando en 7.147, 5.795, 7.314 y 7.429 Å (Figura 23), los porcentajes de cambio (absoluto), para ambos análogos se mencionan en la Figura 23 C.

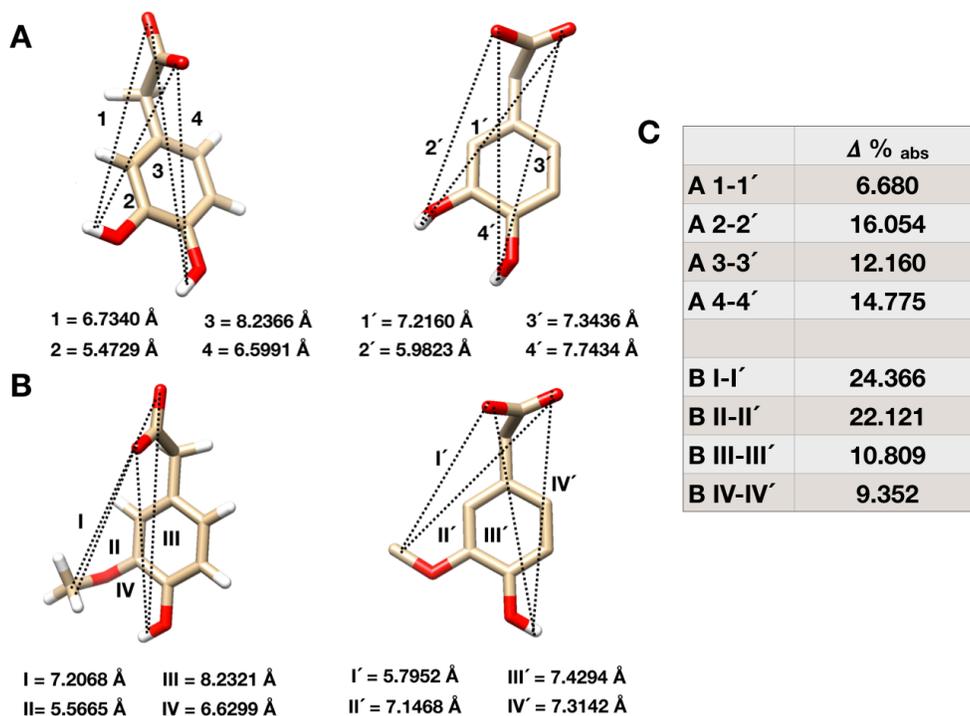


Figura 23. Modificación de distancias en los ligandos ácidos.

A. DOPAC Izquierda modelo optimizado, derecha modelo en acoplamiento, **B.** HVA, izquierda modelo optimizado, derecha modelo en acoplamiento. **C.** Porcentajes de cambio, en valores absolutos.

8.4 Relación Estructura-Actividad.

Considerando los datos de actividad descritos para las moléculas evaluadas y los resultados del acoplamiento molecular, es posible establecer algunas funciones a regiones particulares de los ligandos, comenzando por la región común a todos ellos, el fenilo, cuya función podemos establecerla a través de los resultados de los acoplamientos moleculares, dada su cercanía en todos los acomodos a los dos residuos de Tyr, el 102 (subunidad adyacente), y la 241 (subunidad principal). Por tanto, su papel fundamentalmente se puede asociar a un “estabilizador” al promover el arreglo tipo sándwich con los fenilos de dichos residuos. Considerando a la 2-PEA, es posible establecer que los sustituyentes de la posición 3 y 4 no son los encargados del mecanismo de acción; sin embargo, la presencia de ambos en forma de hidroxilos incrementa la potencia alrededor de 6 veces. No obstante, los resultados del acoplamiento permitieron establecer con mayor precisión el mecanismo por el cual su presencia mejora la actividad del ligando; mientras que el sustituyente de la posición 4 se localiza cerca del residuo Glu 196, ni el hidroxilo o el metoxi tienen en su cercanía residuo alguno con el cual establecer interacción, por lo que su efecto puede estar asociado a la generación de la correcta orientación del ligando, mientras que el hidroxilo de la posición 4 estabiliza de una manera directa a través de la interacción con el residuo 196, el otro sustituyente lo hace a través del impedimento estérico es decir de una manera pasiva. Finalmente, la región de la amina o ácido es el farmacóforo, cuyo efecto se infiere tras los ensayos del acoplamiento molecular, en donde se observa cierto patrón de acercamiento para todos los ligandos, de tal suerte que el mecanismo de acción para el caso de los ácidos es mediante la estabilización de un estado de conducción alterno,

es decir se comporta como un agonista inverso. Por su parte las aminas lo hacen al competir directamente con el agonista, en la Figura 24 se presenta un esquema con lo previamente mencionado.

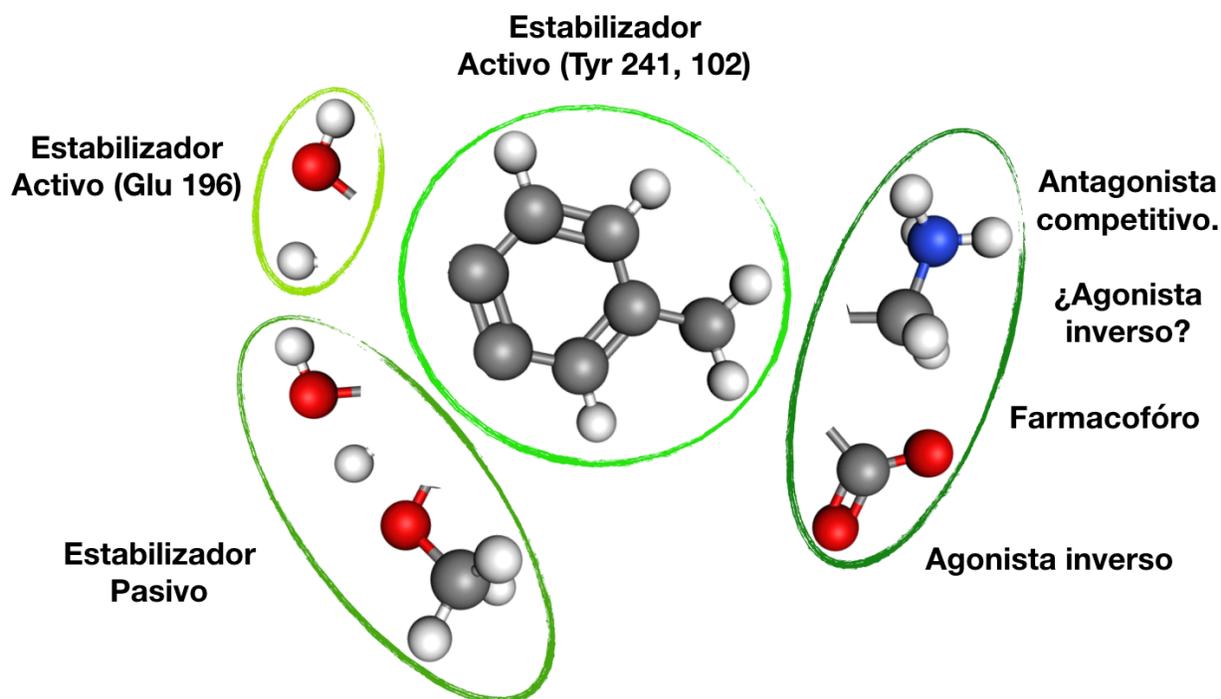


Figura 24. Esquema de las posibles funciones de las regiones del ligando.
De manera general se esquematizan las posibles funciones de las regiones y o sustituyentes.

8.5 Efecto de los análogos sobre el receptor activado.

Los ensayos anteriores se enfocaron en evaluar el papel de los análogos en condiciones que simulan la transmisión fásica (sección 8.1), y a continuación se muestra un modelo de transmisión tónica, el cual consiste en evaluar el efecto de los análogos en un receptor en estado activado, para lo cual se aplicó el GABA hasta alcanzar el periodo de meseta en la corriente y en esa condición se procedió a realizar la co-aplicación con los análogos. En este modelo todos los compuestos mantuvieron el efecto negativo sobre

la corriente producida por GABA, no obstante, la habilidad para inhibir la corriente disminuyó de manera significativa para las moléculas con el amino (3MT, 2-PEA, Figura 25 A); este efecto no fue evidente para los análogos con ácido (HVA, DOPAC, Figura 25 B).

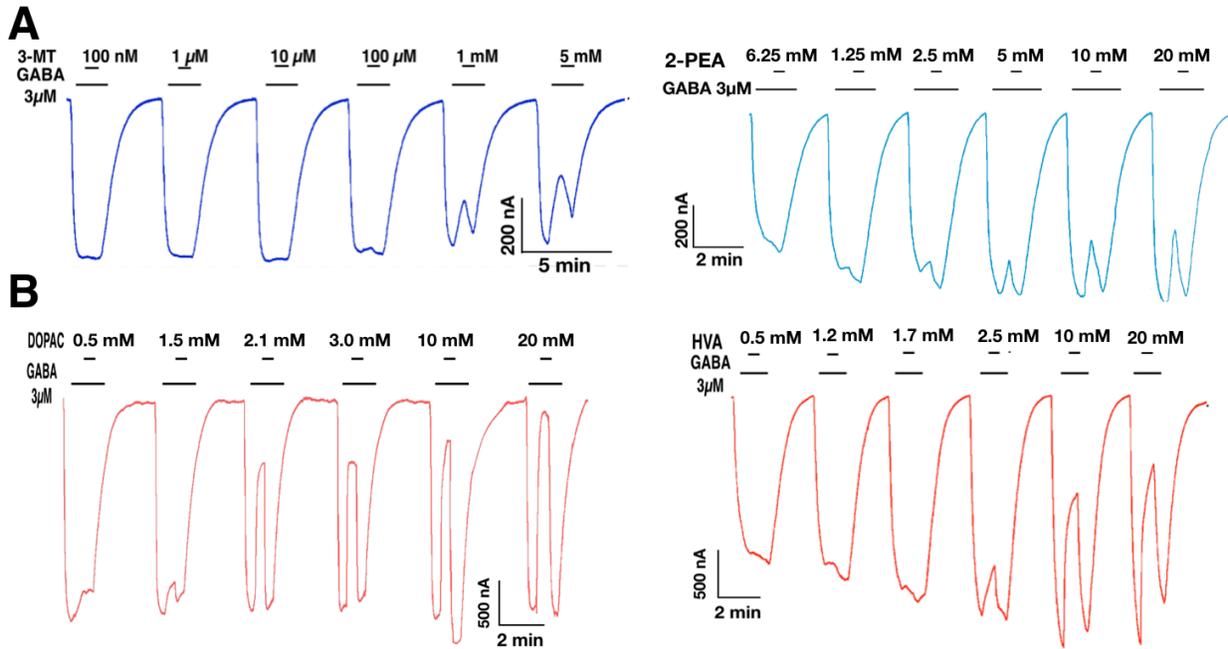


Figura 25. Co-aplicación de análogos en canal activado.

A. Corrientes evocadas por 3 μM de GABA. Tras la activación del receptor se aplicó la mezcla GABA/amina; no se logró observar una inhibición total a la máxima concentración aplicada. **B.** Corrientes evocadas por 3 μM de GABA. Tras la activación del receptor se aplicó la mezcla GABA/Ácido; no se logró observar una inhibición total a la máxima concentración aplicada; sin embargo, la inhibición alcanzó niveles semejantes al modelo de co-aplicación. Cada punto se evaluó en 6 ovocitos de 2 ranas diferentes.

La inhibición máxima de la 3-MT fue de $51.65 \pm 6.93 \%$ y $36.62 \pm 11.44 \%$ para la 2-PEA; estos cambios fueron significativos. Los valores de IC_{50} fueron de $520 \pm 230 \mu M$ y de $3.00 \pm 1.13 \text{ mM}$, para 3-MT y 2-PEA, respectivamente, sin que estos cambios fuesen significativos respecto del valor en el modelo de co-aplicación.

Para el caso de los ácidos, tanto la eficacia como la potencia se mantuvieron sin cambios significativos, pues la inhibición máxima estimada fue de $90.95 \pm 5.99 \%$ y $82.32 \pm 1.64 \%$ para el DOPAC y HVA respectivamente; en el mismo orden, los valores de IC_{50} son de $1.87 \pm 0.059 \text{ mM}$ y $2.77 \pm 0.39 \text{ mM}$, cuya variación como ya se mencionó no es significativa respecto del modelo de co-aplicación (Figura 26).

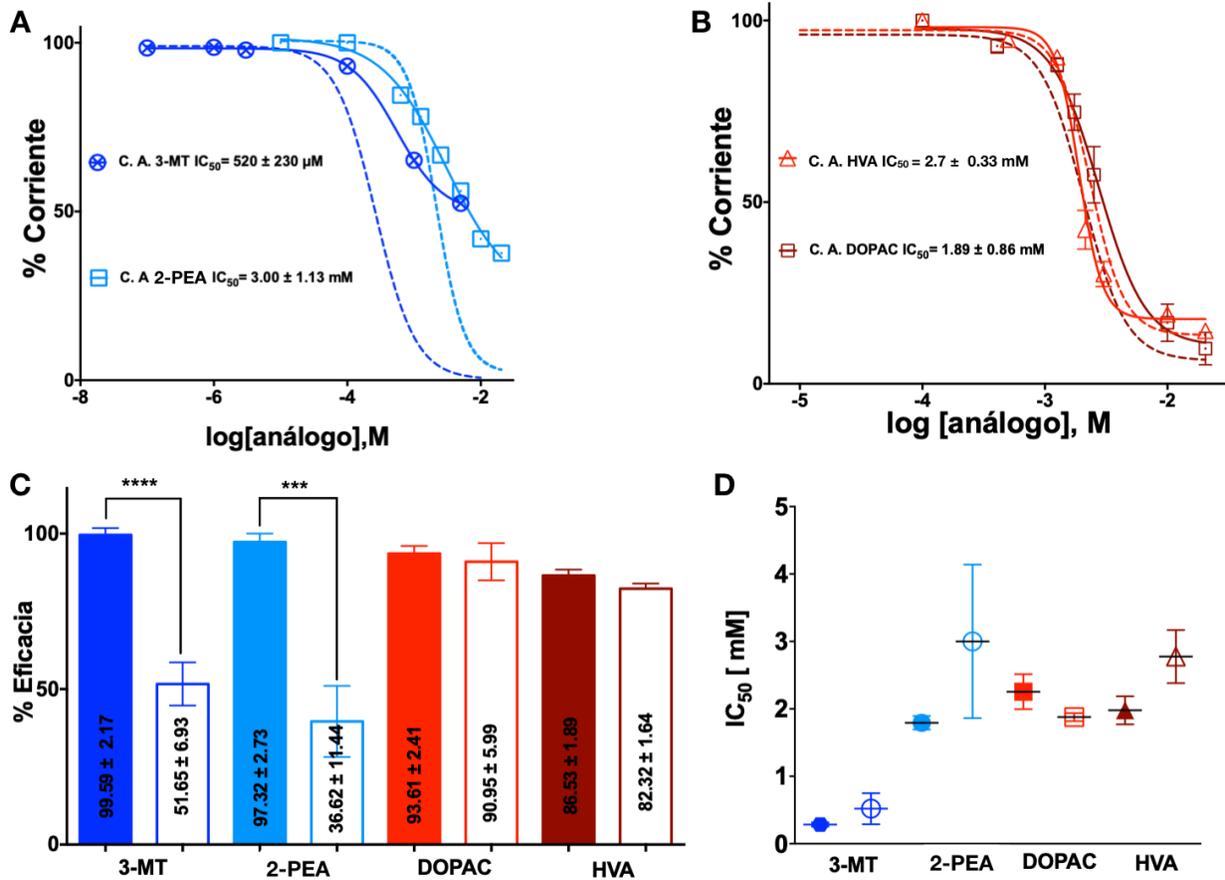


Figura 26. Análisis de los efectos de los análogos en receptor activado.

A. Curvas concentración-respuesta para las aminas; en líneas punteadas la curva en modelo de co-aplicación, en línea continua la aplicación en canal activado. **B.** Curvas concentración-respuesta para los ácidos; en líneas punteadas la curva en modelo de co-aplicación, en línea continua la aplicación en canal activado. **C.** Comparación de inhibición máxima estimada; barras color sólido datos de modelo de co-aplicación, en barras sin relleno valores estimados para modelos de aplicación en canal activado; el valor estimado para cada análogo se encuentra dentro de cada barra. Diferencias significativas para el caso de 3-MT, **** <0.0001 , *** $=0.0006$. **D.** Comparación de los valores de IC_{50} , en ambos modelos; figuras con fondo sólido, modelo de co-aplicación, figuras sin relleno representan los valores en canal activado; sin cambios significativos para ningún análogo.

8.6 Comparación de mecanismos de acción.

Considerando que los resultados en el canal activado mostraron que la eficacia de las aminas decae alrededor de un 50 %; es posible considerar que existe un segundo mecanismo de acción para las aminas, el cual no necesariamente implica un segundo sitio de unión.

Para explorar la posibilidad de un segundo mecanismo de acción para las aminas, se planteó la adaptación de una aproximación farmacológica, conocida como isoblograma, la cual postula que la habilidad de un fármaco para ejercer su efecto se ve disminuido por la presencia de un segundo compuesto, si es que estos comparten el mecanismo de acción; sin embargo, si dichos fármacos ejercen su efecto a través de mecanismos diferentes, la suma de sus efectos se verán potenciados (Breitinger, 2012), por tanto la estrategia empleada consistió en evaluar de manera individual y en mezcla (dos análogos) el efecto de los ligandos.

Para la adaptación del modelo de Breitinger (Breitinger, 2012), en este trabajo se consideró el enfoque propuesto por Verdoorn, en el cual se estima como respuestas “lineales“, a las comprendidas entre los rangos de IC_{20} a IC_{80} aproximadamente (Verdoorn et al., 1998, Limon et al., 2010). Por tanto, en el diseño de los ensayos se ponderó, que el efecto individual no fuese menor al 20% y que la suma de los efectos no superen el 75% de inhibición.

En los ensayos se usaron los valores de IC_{25} ; sin embargo, en cada experimento en donde se validó que dicho efecto inhibitor no fuese menor del 20% del efecto máximo, y que la suma no excediese el 75%, por lo que los valores que a continuación se muestran se consideran la suma teórica de los efectos individuales obtenidos en los

ensayos, es decir la suma teórica es el 100%, el cual se contrasta con el valor experimental de la mezcla entre ambos antagonistas.

En el primer ensayo se consideró que las aminas y los ácidos no comparten la misma orientación en la región acida o amina, el segundo consistió en evaluar el efecto de la 3-MT y el DOPAC, en el modelo de co-aplicación en el que los valores de la suma fueron superiores al teórico ($143.6 \pm 9.5 \%$, Figura 27 A, B y C).

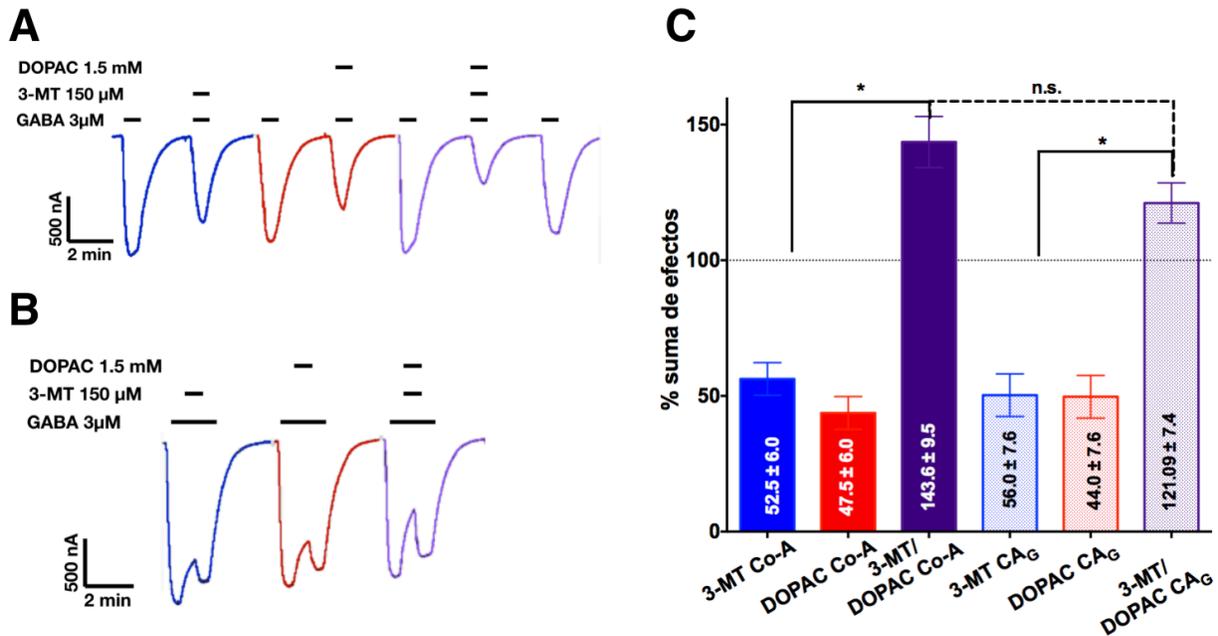


Figura 27. Comparación mecanismos de acción entre la 3-MT y el DOPAC.

A. Registros muestra de la co-aplicación, de GABA/3-MT, GABA/DOPAC y GABA/3-MT/DOPAC. **B.** Trazo aplicación de análogos canal previamente activado con GABA (CA₆), GABA/3-MT, GABA/DOPAC y GABA/3-MT/DOPAC. **C.** Los valores de 3-MT co-A y DOPAC co-A, son normalizaciones respecto de la suma teórica de los efectos en ensayos individuales, el valor de 3-MT co-A/DOPAC co-A es el valor normalizado del efecto determinado experimentalmente respecto de la suma teórica (los valores se encuentran denotados dentro de cada barra). Misma metodología empleada en el modelo CA₆, para 3-MT, DOPAC y 3-MT/DOPAC. Los valores experimentales de GABA/3-MT/DOPAC en ambos casos son significativamente diferentes de la suma teórica con valores P de 0.019 y 0.046 para el modelo CoA y CA₆, respectivamente, sin diferencia significativa entre ellos.

Considerando el resultado de la orientación compartida por las dos aminas, se realizó el ensayo en las mismas condiciones previamente descritas, con el reemplazo del DOPAC por la 2-PEA; los resultados mostraron para el caso de la co-aplicación que la suma de efectos fue de $94.9 \pm 4.5 \%$ (Figura 28 A), lo cual es consistente con un mecanismo en común. La siguiente aproximación consistió en la evaluación en condiciones de canal abierto, en donde el valor de la inhibición fue de $88.1 \pm 1.8 \%$ (Figura 28 B), ambos modelos en comparación con la suma teórica no presentaron diferencia significativa (Figura 28 C).

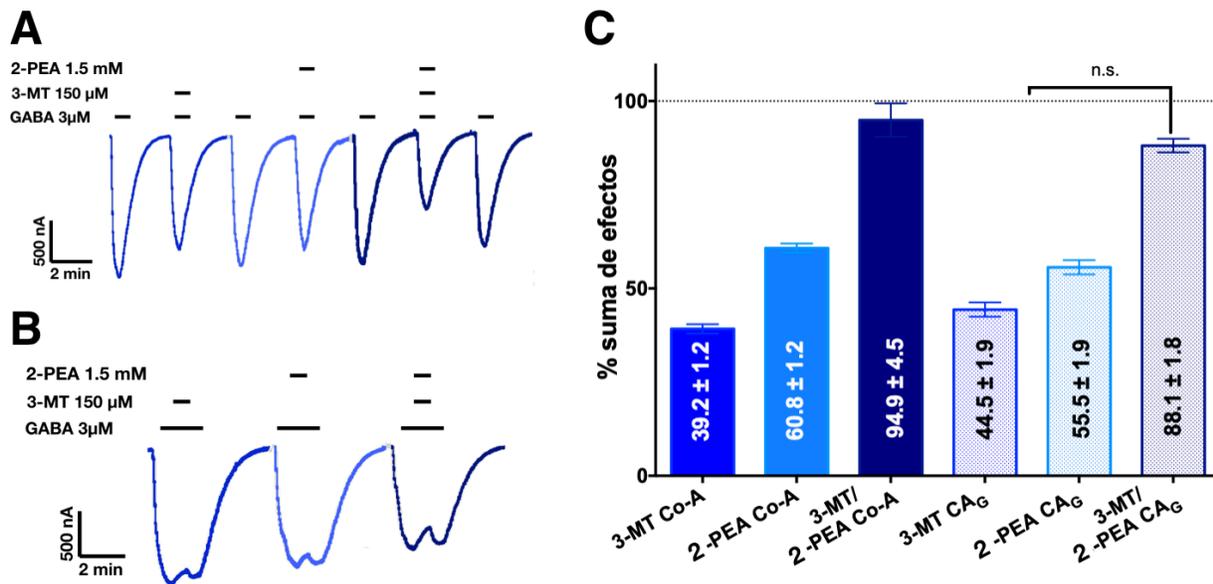


Figura 28. Comparación mecanismos de acción entre la 3-MT y la 2-PEA.

A. Registros muestra de la co-aplicación, de GABA/3-MT, GABA/2-PEA y GABA/3-MT/2-PEA.

B. Aplicación análogos con el canal previamente activado por GABA (CA_G), GABA/3-MT, GABA/2-PEA y

GABA/3-MT/2-PEA. **C.** Los valores de 3-MT, 2-PEA, son normalizaciones respecto de la suma teórica de

los efectos en ensayos individuales, el valor de 3-MT co-A/2-PEA co-A es el valor normalizado del efecto

determinado experimentalmente respecto de la suma teórica (los valores se encuentran denotados dentro

de cada barra). Misma metodología empleada en el modelo CA_G, para 3-MT, 2-PEA y 3-MT/2-PEA. Los

valores experimentales de GABA/3-MT/2-PEA en ambos casos son las diferencias no significativas.

Si bien las aminas comparten sitio de unión tanto en el modelo de co-aplicación así como en el canal activado, esto mismo no implica que dicho sitio de unión sea el mismo en ambos modelos de activación del receptor (abierto y cerrado), por tanto existe la posibilidad de un segundo sitio de unión el cual solo es accesible durante la conformación activa del receptor (Yamamoto et al., 2012). Por tanto, se aplicó el mismo protocolo anteriormente descrito, modificando los estados conformacionales, en el que la 3-MT se co-aplicó y con la 2-PEA en canal abierto (Figura 29 A), la suma de los efectos fue de 85.7 ± 5.3 % (Figura 29 B).

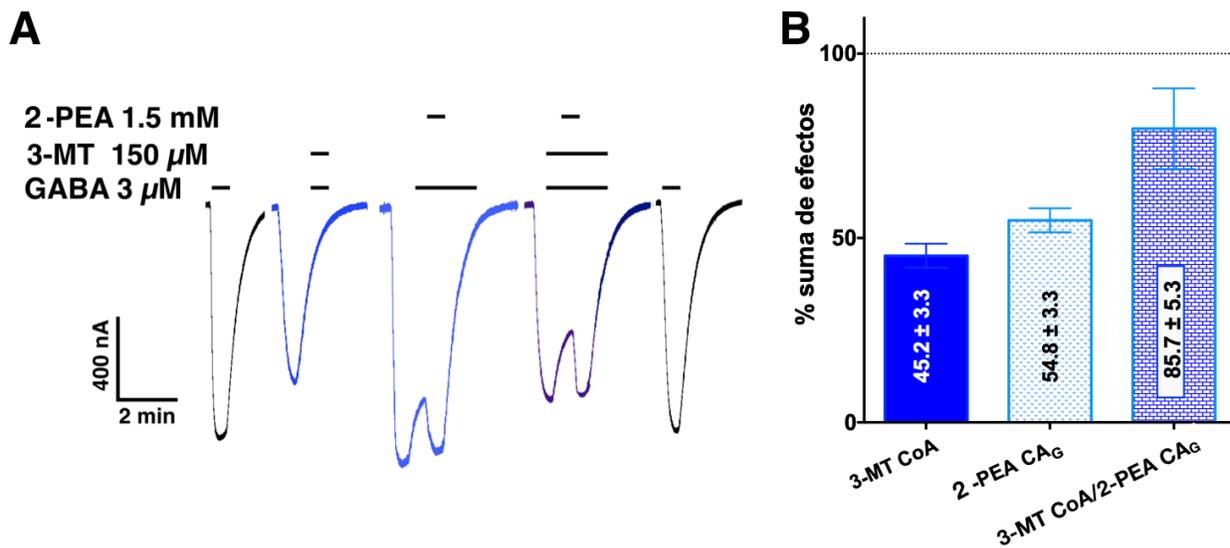


Figura 29. Comparación mecanismos de acción entre la 3-MT y la 2-PEA, en diferentes estados de activación del canal.

A. Trazo co-aplicación (CoA), de GABA/3-MT, en canal activado por GABA (CA_G), GABA/2-PEA y GABA/3-MT, CoA, GABA/3-MT/2-PEA CA_G. **B.** Los valores de 3-MT co-A y 2-PEA CA_G, son normalizaciones respecto de la suma teórica de los efectos en ensayos individuales, el valor de 3-MT co-A/2-PEA CA_G es el valor normalizado del efecto determinado experimentalmente respecto de la suma teórica (los valores se encuentran denotados dentro de cada barra). no se encontraron diferencia significativa entre el valor experimental y el teórico.

9. DISCUSIÓN.

Los resultados muestran la modulación negativa de los análogos de la DA sobre los receptores $GABA_{A-\rho 1}$ expresados en ovocitos de *X. laevis*, los efectos son dependientes de la concentración e independientes del voltaje. El efecto es consistente con lo previamente reportado para otras aminas como la DA, 5-TH, tiramina y octopamina sobre el receptor $GABA_{A-\rho 1}$ de humano y de cerdo expresados en los ovocitos de rana (Ochoa-de la Paz et al., 2012, Reyes-Ruiz et al., 2014), y los efectos bimodales de la DA sobre los receptores $GABA_A$ que contienen a la subunidad β (Hoerbelt et al., 2015).

En la presente investigación se evaluaron los efectos de algunos análogos de la DA, de los cuales solo la 2-PEA no pertenece a la vía de la biosíntesis de las monoaminas en humanos, de los restantes la L-DOPA, la norepinefrina y la epinefrina los metabolitos de la parte anabólica de dicha vía; por su parte la 3-MT, el DOPAC y el HVA conforman la parte catabólica. En la Figura 30 se muestra un esquema de la vía dopaminérgica.

Los ensayos de co-aplicación permitieron identificar que los análogos de la DA, con más de una sustitución en el etilo (L-DOPA, adrenalina y noradrenalina), no afectan la corriente generada por el GABA en los receptores $GABA_{A-\rho 1}$, este fenómeno pudiese explicarse en función de un impedimento estérico del sustituyente. Cabe mencionar que en los tres casos dicho grupo funcional se encuentra en la orientación "R" y los compuestos evaluados fueron los enantiómeros puros, por lo que no es posible determinar el efecto de la mezcla racémica o el enantiómero "S". Existen reportes de compuestos con orientaciones tipo "S" con actividad sobre el receptor $GABA_{A-\rho 1}$ (Johnston et al., 2010), por lo que es razonable plantear la evaluación de dichos enantiómeros en futuros ensayos.

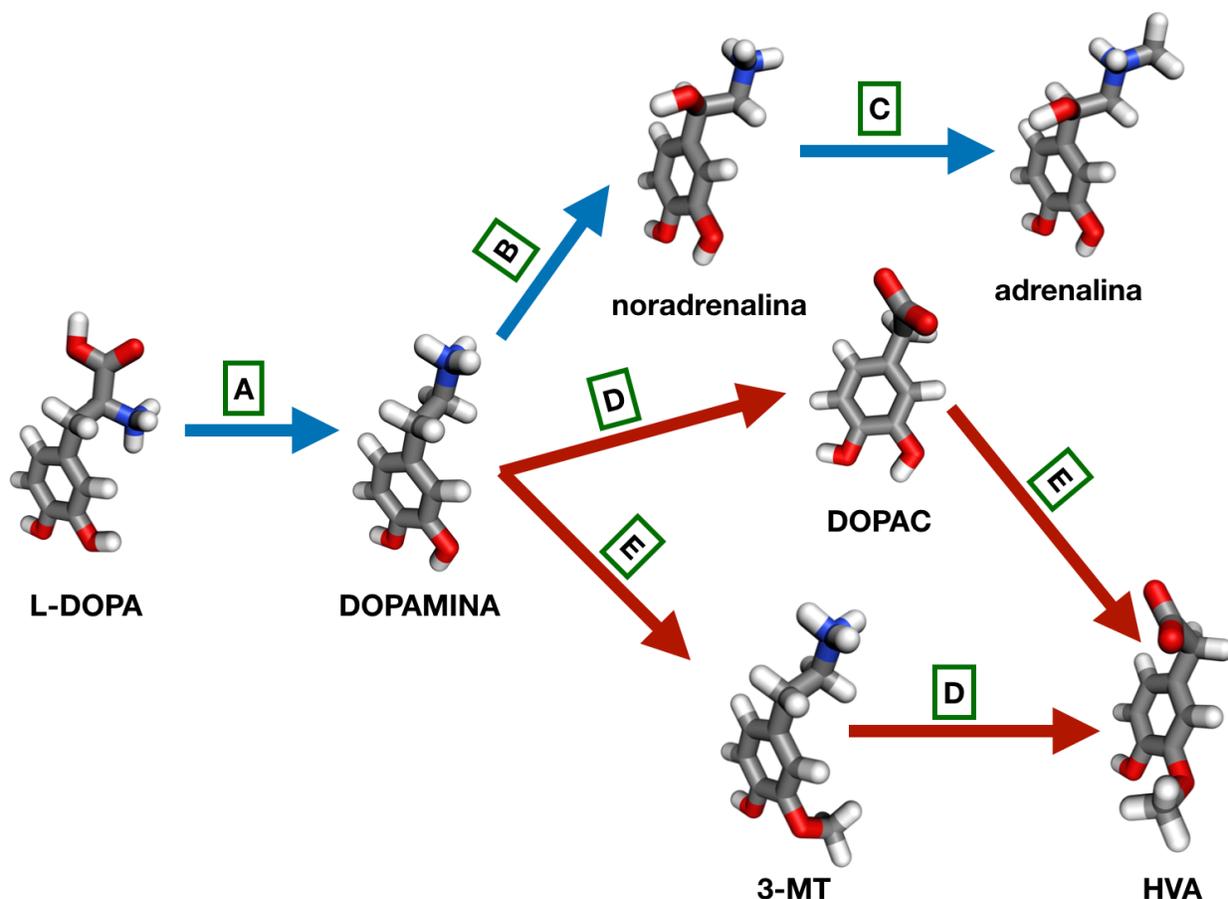


Figura 30. Esquema de la Biosíntesis de las monoaminas.

Biosíntesis de las monoaminas. La flecha azul indica la ruta anabólica, la flecha roja muestra la parte catabólica. Letras arábigas mayúsculas en recuadro, representan las enzimas implicadas en la biosíntesis del metabolito. **A.** dopa-decarboxilasa; **B.** dopamina beta-hidroxilasa. **C.** feniletanolamina N-metiltransferasa. **D.** monoaminoxidasa. **E.** catecol O-metiltransferasa.

La potencia de los compuestos que modularon respuestas del receptor, no puede atribuirse directa y principalmente a la presencia del grupo funcional del extremo etilo, no obstante que en el caso de la 3-MT, al igual que la DA tienen como sustituyente a una amina, la potencia de ambas son muy cercanas, dado que sus valores de IC_{50} determinado en esta investigación para el 3-MT es $285 \pm 30 \mu M$ el cual es muy cercano al reportado para la DA ($210 \pm 11.2 \mu M$, Ochoa-de la Paz et al., 2012). Considerando que la diferencia entre ambas moléculas es el reemplazo del hidrógeno por un metilo en el

oxígeno de la posición 3 del anillo de benceno, por tanto se puede asumir que dicho cambio no interfiere en el proceso que involucra a este oxígeno, además de que este sustituyente no es indispensable para el efecto de dichas moléculas, ya que en un estudio previo se demostró que la tiramina (una feniletilamina, que carece de este sustituyente), modula negativamente las corrientes de GABA, sin embargo, la potencia de esta amina es poco más de la tercera parte respecto de la DA ($550 \pm 10.3 \mu\text{M}$, Ochoa-de la Paz et al., 2012). Estos datos en suma con la evidencia actual sugieren que el oxígeno tiene un aporte significativo sin ser indispensable, en el proceso de modulación, el cual no se ve afectado por la presencia de un sustituyente de mayor volumen (el hidrógeno es reemplazado por un metilo).

La 2-PEA, es una feniletilamina cuyos sustituyentes en la posición 3 y 4 son hidrógenos, la cual modula de manera negativa las corrientes del receptor $\text{GABA}_{\text{A-}\rho 1}$; sin embargo, con respecto a la DA y el 3-MT, su potencia es seis veces menor ($1.98 \pm 0.10 \text{ mM}$). Este efecto puede atribuirse a que carece de los oxígenos que participan en el proceso de reconocimiento, pero no son esenciales para la acción sobre el receptor. El papel de estos oxígenos estaría más relacionado con el proceso de estabilización y con la orientación de la molécula.

Por su parte la región aromática de los compuestos, el fenilo, presente en todas las moléculas evaluadas, es un sustituyente con capacidad limitada para establecer interacciones, por lo que su papel como principal responsable del efecto observado sobre los receptores $\text{GABA}_{\text{A-}\rho 1}$, es poco probable; por tanto, sería lógico asignar el papel de farmacóforo a la región de la amina. Sin embargo, dicha aseveración presenta un inconveniente, dado que también se mostró que tanto el DOPAC y HVA (en cuyas

estructuras se encuentra sustituida la amina por un ácido carboxílico), son moduladores negativos, pese a que esas últimas moléculas (DOPAC y HVA), no lograron inhibir por completo las corrientes producidas por GABA en el receptor $GABA_{A-p1}$, ante este fenómeno, existen al menos dos explicaciones, una basada en las concentraciones de análogos evaluados, pues por cuestiones técnicas no fue posible, explorar concentraciones de más de 20 mM y que por tanto el remanente de corriente podría ser abatido por una mayor concentración de los análogos, no obstante que los datos (concentraciones evaluadas) fuesen suficientes para que los análisis, mostraran un alto grado de correlación entre los datos y los valores estimados ($R^2 = 0.986, 0.957, 0.977, 0.976$, para 3-MT, 2-PEA, DOPAC y HVA).

Una segunda explicación estaría basada en mecanismos de acción diferentes, los cuales no implicarían necesariamente sitios de unión diferentes.

Esta propuesta estaría cimentada en las siguientes observaciones:

1. El DOPAC y el HVA, modulan de manera negativa al receptor $GABA_{A-p1}$, pese a no tener a la amina en su estructura (IC_{50} de 2.25 ± 0.26 y 1.97 ± 0.21 mM respectivamente).
2. Respecto de la 3-MT la disminución de la potencia del DOPAC y del HVA (8.7 y 7.6 veces menor respectivamente) no puede ser explicada en función de los elementos estabilizadores de la molécula (el fenilo y los dos oxígenos en posición 3, 4), pues en ambos casos están presentes.
3. La estimación de inhibición máxima para la 3-MT y la 2-PEA es del 100%, mientras que el DOPAC y el HVA no alcanzan este nivel; de tal suerte que si se considera que

la diferencia entre los antagonistas y los agonistas inversos radica en que los primeros carecen de actividad y los segundos estabilizan al receptor en un estado particular (Ylilauri and Pentikäinen, 2012, Salazar et al., 2017), los análogos evaluados en este proyecto se pueden clasificar como antagonistas (3-MT, 2-PEA) y agonistas inversos (DOPAC, HVA), es decir tienen efectos similares e inclusive pueden compartir sitio de unión, pero pueden presentar mecanismos diferentes.

Una opción para explicar mecanismos diferentes estaría basada en que dichas moléculas no comparten sitio de unión, quedando en el sustituyente (amino o ácido), la habilidad de reconocer la región en que se une el compuesto. En este escenario y considerando el pH en que se evaluaron los compuestos (pH= 7.4), las moléculas se encontrarían mayormente en su forma ionizada, y por tanto los ácidos podrían interaccionar con los residuos que forman el vestíbulo, puesto que esta zona tiene un papel de prefiltro (Estrada-Mondragón, 2011) o con el poro. Sin embargo, este lugar es inaccesible para las aminas, dada la carga neta de éstas. Las relaciones corriente-voltaje mostraron que la inhibición de todos los compuestos fue independiente del potencial de membrana, con lo que se asume que no ocupan un lugar en las regiones del vestíbulo o el poro del receptor.

Para determinar si los compuestos ocupan el sitio de unión a GABA, se realizaron ensayos de competencia; los resultados muestran que el GABA desplaza a la 3-MT, la 2-PEA y el DOPAC y por tanto se establece que los análogos tienen su efecto tras unirse en el sitio ortostérico del receptor, lo cual no implica que estos ligandos compartan el mismo mecanismo de acción.

Al establecer que los compuestos se unen al sitio de unión al GABA los estudios *in silico* se centraron en el sitio ortostérico que consta de los 20 residuos implicados en el proceso de unión del GABA, con lo cual se determinaron las orientaciones de los ligandos.

El modelo empleado en este análisis, fue el descrito por Limón, el cual a su vez se basa en el modelo obtenido por difracción de rayos X de la proteína cristalizada de un receptor de GABA_A conformado por subunidades $\beta 3$ de humano (Miller and Aricescu, 2014); cabe mencionar que la subunidad $\beta 3$ es sensible a la DA (Hoerbelt et al., 2015), tal y como la subunidad $\rho 1$.

El receptor GABA_A se co-cristalizó con una benzamida, la cual es una amida con una región aromática (fenilo), la cual guarda semejanza con los compuestos investigados en este proyecto. La benzamida estabilizó al receptor en una conformación diferente a la que se esperaría para un canal activado, es decir algunas zonas del dominio extracelular pudiesen ser más cercanas a la configuración del receptor activo. Existen dos zonas del receptor que no guardarían semejanza con el estado conductivo, una de estas zonas es el pase transmembranal 2, el cual se ubica en una posición que no permite el flujo aniónico, y la otra zona sería el sitio de unión del agonista, cuya distribución espacial es más cercana a la de un estado inactivo, esto debido a que al generar el acoplamiento para el agonista esta molécula mostró una reducción en la longitud medida del nitrógeno al carbono del carbonilo, lo cual es consistente con la interpretación de la selectividad del CACA por el receptor GABA_{A- $\rho 1$} y por tanto el espacio en el modelo se asemeja más a un sitio no modificado por la presencia del GABA (Miller and Aricescu, 2014).

Múltiples modelos de acoplamiento molecular, ubican al GABA y al TPMPA en una orientación paralela a la membrana (Harrison and Lummis, 2006a, Osolodkin et al., 2009, Lummis et al., 2012, Naffaa et al., 2016); sin embargo, los residuos con que establecen interacciones no son conservados en los modelos propuestos. Pero en todos los trabajos mencionados, muestran que la región ácida del GABA establece un contacto con la arginina¹⁰⁴. En el presente trabajo se observa dicha interacción e inclusive la cercanía con la treonina²⁴⁴, reportada en el modelo de Naffaa (Naffaa et al., 2016); también se observa la cercanía de la porción amino del GABA con la serina¹⁶⁸, lo cual es consistente con lo propuesto por Selednikova como una de las primeras interacciones que establece el GABA, con la cual se estabiliza al ligando en el sitio de unión (Sedelnikova et al., 2005).

Todos los compuestos ocuparon una disposición similar en el sitio ortostérico, dicha orientación es muy cercana al plano perpendicular que ocupa el GABA, en la que el fenilo tiene una orientación muy similar a la observada para la benzamida en la estructura cristalizada (Miller and Aricescu, 2014), la que se estabiliza en esa orientación por un fenilo que pertenece a una fenilalanina y que en el receptor GABA_{A-ρ1}, corresponde a una tiramina. Los sustituyentes en la posición 4 de los análogos posiblemente interaccionan con el glutamato¹⁹⁶, este residuo se reporta en la estructura cristalizada con igual capacidad para interaccionar con el oxígeno del grupo ceto de la benzamida. Por tanto, estos dos residuos del receptor GABA_{A-β3}, pueden considerarse como altamente confiables para la función asignada en el receptor GABA_{A-ρ1} por su similar disposición espacial y por su capacidad de generar interacciones con el ligando.

El oxígeno de la posición 3 de los compuestos, tanto en su conjugación con el hidrógeno o el metilo, tiene a 6 residuos con una distancia menor a 5 Å (tirosina^{241, 102}, arginina²⁴⁹, valina¹⁴⁰, y glutamina⁸³), de los que descartan las dos tirosinas, pues estas estabilizan el fenilo, del resto de los residuos no es posible considerar entre ellos a alguno en particular con el cual establecer una interacción, si bien se ha establecido que este sustituyente tiene un papel en la orientación de la molécula dentro del sitio de unión, pero al no poder determinar a alguna posible interacción, la función de esta región podría considerarse como un orientador pasivo.

En el caso de las regiones de la amida y ácido, su reconocimiento en el sitio de unión a GABA, se observó que el residuo más cercano en tres de los casos fue la tirosina¹⁹⁸, la excepción fue el DOPAC; sin embargo, este residuo se ubica solo detrás de la arginina¹⁰², la cual fue el segundo en distancia, lo que implica que los oxígenos del carbonilo pueden establecer contactos simultáneos. Estos residuos se encuentran en una disposición en diagonal considerado como un rectángulo conformado por los 4 residuos, los cuales pertenecen a diferentes subunidades. La asociación del GABA con la arginina¹⁰⁴ induce un movimiento de las asas, con lo que inicia el proceso de apertura del canal (Estrada-Mondragón, 2011, Naffaa et al., 2016), por tanto es posible que las interacciones del carbonilo del ligando provoque un movimiento similar.

Las aminas tienen un patrón de proximidad diferente pero similar al HVA respecto a su cercanía con la tirosina¹⁹⁸. El siguiente residuo en el orden es la serina¹⁶⁸, seguida por la arginina¹⁰² para finalizar con la treonina²⁴⁴, por consiguiente, las principales interacciones que pueden establecer son en dirección paralela, este mismo patrón es el

descrito para la amina del GABA, cuya función sugerida es la estabilización del agonista en el sitio de unión (Sedelnikova et al., 2005).

En base a lo anterior es posible sugerir el papel de las regiones funcionales de los análogos:

- 1.- El sustituyente de la posición 4 el hidroxilo, se asemeja a un farmacóforo por la interacción que puede generar con el glutamato 196, funcionando a manera de “bisagra”.
- 2.- Los oxígenos (posición 3), no establecen un contacto con el receptor, por tanto, pueden ser considerados como un orientador pasivo, como resultado de un efecto de impedimento estérico que no se ve fuertemente impactado por la presencia de un metilo.
- 3.- El anillo de fenilo, ejerce un efecto estabilizador al estar situado entre los fenilos.
- 4.- La región de la amina o el ácido. Por su orientación son los causantes directos del efecto sobre el receptor, pues en el caso de la amina su cercanía con los residuos implicados en la estabilización del GABA, en los ensayos de co-aplicación su efecto es total, sin embargo, no posee actividad sobre el receptor. Los ácidos establecen un contacto en forma diagonal con el receptor que podría conllevar a un movimiento de asas que lleva al receptor a un estado de conducción diferente pero únicamente cuando el receptor está activado. Para activar al receptor $GABA_{A-p1}$, son necesarios la unión de tres moléculas de GABA (Amin and Subbarayan, 2017), quedando libres 2 sitios, lo cuales pueden ser ocupados por los ácidos (DOPAC o HVA), por tanto cuando estas moléculas se unen a estos sitios llevan al receptor a un estado de conducción disminuida, lo que sugiere que estos ácidos son agonistas inversos.

Lo anterior ofrece una aproximación respecto del mecanismo de acción de los compuestos, sin embargo, no aporta una explicación de las respectivas potencias, ya que no se identificó algún patrón que relacione la distancia entre la molécula y los residuos con la potencia. Una explicación alternativa radica en las conformaciones espaciales individuales que adquieren los ligandos para establecer los respectivos contactos. El programa de acoplamiento utilizado (Autodock Vina), permite modificar la conformación dentro de los límites determinados por los enlaces de la molécula y estos cambios se realizan principalmente en la orientación de los sustituyentes.

Las orientaciones propuestas por el acoplamiento incluyeron modificaciones en la estructura tridimensional del ligando, particularmente en los ángulos diedros con un importante impacto en la distancia que separa a los grupos funcionales. En el caso de la 2-PEA, con cambios en sus ángulos considerando como base al fenilo (79.59° de rotación) y al nitrógeno (39.94°), inducen un cambio en la distancia del carbono 1 del fenilo al nitrógeno de la amina lo que representa una disminución del 4.52 % de la longitud original. En el caso de la 3-MT, la distancia entre los grupos funcionales fue un 3.77 y 12.85 % menor al modelo optimizado (sustituyentes posición 3 y 4 respectivamente). En el caso del DOPAC el re-acomodo de la orientación del plano conformado por los oxígenos del carbonilo (rotación de casi 90°), implicó que tres distancias se redujeran (7.15, 9.3 %, respecto de la posición 3), en la posición 4 una distancia se incrementó un 10.34% y la otra se redujo en un 17.34%. Para el HVA las rotaciones de los sustituyentes de las posiciones 3 y 4, indujeron disminución en las distancias de ambos, en un 19.58 y 9.7 % (3, 4), y aumento en la distancia respecto del otro oxígeno en un 28.38 y 10.32%. Esto es posible dado que los enlaces en los ligandos

pueden adoptar múltiples orientaciones, cada una de estas conformaciones tiene asociada un nivel de energía, considerando que la conformación de mínima energía es la que se considera como la configuración optimizada y por tanto es el arreglo que mayor probabilidad tiene de encontrarse en un momento dado y que entre mayor sea la desviación respecto a éste, mayor será la energía requerida en ese estado particular, lo que a su vez repercutiría en la probabilidad de encontrar esa conformación en particular, por lo tanto la manera de incrementar ésta, es aumentar el número de moléculas de ligando. Lo anterior puede servir como guía para el desarrollo de compuestos con actividad sobre el receptor GABA_{A-p1}, los cuales además de mayor potencia, sería posible elegir un mecanismo de acción definido (antagonista u agonista inverso).

La participación del receptor GABA_{A-p1}, en la transmisión tónica ha sido determinada en el cerebelo y la retina (Harvey et al., 2006, Jones and Palmer, 2011), por tanto en la presente investigación se planteó un escenario en que el receptor se encontrara de manera activa, antes de que el análogo (antagonista), entre en contacto con éste. Para este modelo se consideró que el receptor debía estar activado y en fase estable.

En estas condiciones, los ácidos (HVA y DOPAC) no mostraron cambios en su habilidad para modular las corrientes inducidas por el GABA, de igual manera el valor de la IC₅₀, no varió de manera significativa respecto del modelo de co-aplicación. Estos datos se ajustan al mecanismo previamente propuesto para estos ligandos, en el cual es necesario que el receptor esté activado para que las moléculas ejerzan su efecto.

La concentración requerida para obtener la mitad del efecto máximo de las feniletilaminas no cambió de manera significativa respecto de la co-aplicación (Figura 25

B), pese a que el valor fue semejante, la capacidad para inhibir la corriente generada por el GABA se redujo a casi la mitad en ambos casos.

Este comportamiento ha sido previamente descrito para diterpenos de tipo ginkgólido, que modulan de manera alostérica y negativa la actividad del receptor GABA_{A-p1}, y que de manera similar a lo observado para las aminas reportadas en esta investigación, su eficacia se ve disminuida cuando interaccionan con un canal previamente activado (Huang et al., 2012). Esto se explica en función de la presencia de un segundo sitio de unión para estos ginkgólidos que es inaccesible para los ligandos cuando el receptor está cerrado, y se expone cuando el receptor está en un estado conductivo. Otro caso de eficacia dependiente del estado de activación del receptor es el de la gabazina, SR-95813 la cual se une al sitio ortostérico, cuya eficacia en un modelo de co-aplicación inhibe por completo la corriente evocada por el GABA, sin embargo al ser evaluado en un receptor mutado (Y102S), el cual se encuentra constitutivamente abierto su eficacia decae cerca de un 40%, (Yamamoto et al., 2012), concluyendo que el ligando establece una interacción fundamental con la tirosina¹⁰², y que dicha interacción no es posible con la serina.

Las aminas no inhiben por completo las corrientes generadas por GABA_{A-p1} por lo que no pueden ser consideradas como antagonistas, ya que como se argumentó para los ácidos en el modelo de co-aplicación, las aminas necesariamente deberían de actuar por un mecanismo diferente a evitar la unión del GABA, este mecanismo alternativo podría tener al menos tres variantes:

1. Su unión en el sitio ortostérico, en el que de manera similar a los ácidos ocupe alguno de los sitios no ocupados por el GABA y lo lleve a un estado de conducción disminuida.
2. Su unión a un segundo sitio, disponible solo cuando el receptor está activado y ejecutando una modulación alostérica como lo sugerido por Huang para los ginkolidos.
3. La amina ocupa el sitio de unión al GABA estableciendo una competencia por este sitio, sin embargo, al desplazarlo en vez de llevarlo a un estado cerrado lo estabiliza en un estado de conducción disminuida.

Para abordar y tratar de determinar la validez de alguna de las tres propuestas anteriores, los ensayos de comparación de mecanismos de acción aportaron información interesante, los resultados obtenidos en el primer protocolo permitieron establecer que en el modelo de co-aplicación, para la mezcla de análogos (3-MT, DOPAC), los efectos se potenciaron. Esto puede explicarse considerando que el mecanismo de acción de la amina consiste en evitar que el GABA se una al receptor, mientras que el ácido (DOPAC), solo puede ejercer su efecto en el receptor $GABA_{A-p1}$ activado (es decir en aquellos en que la 3-MT, no logró desplazar al GABA y unirse en los sitios libres de este receptor) y por tanto no existe una competencia entre la 3-MT y el DOPAC. Por tanto, la propuesta 1, acerca de ocupar uno de los sitios no usados por el GABA quedaría descartada.

La otra mezcla de análogos (ambas aminas), en su primera parte (co-aplicación), permitió confirmar que las aminas comparten mecanismo de acción (dado que el efecto de la mezcla quedo por debajo de la suma teórica), el cual es de tipo antagónico con

competencia por el sitio de unión. La segunda parte de este ensayo mostró la misma competencia entre las aminas en un canal activado, por lo que se infiere que ambas comparten el mecanismo de acción, sin embargo, esto no implicaría que las aminas tengan el mismo mecanismo de acción en el modelo de co-aplicación y canal activado. En la tercera parte se trató de determinar si existe un segundo sitio de unión los datos sugieren que éste no existe; sin embargo, este ensayo no establece un segundo mecanismo de acción, el cual como fue propuesto puede ser a través de la estabilización de un estado alterno, toda vez que se logra el desplazamiento de una o dos moléculas del GABA.

Una posible explicación es que las aminas, al unirse al sitio del agonista, en donde su disposición es independiente del estado del canal, la interacción formada con los residuos serina¹⁶⁸ y tirosina¹⁹⁸, modifica la distancia entre estos residuos, así el canal se estabiliza en otro estado de conductividad diferente, previo al desplazamiento de al menos uno de los tres agonistas necesarios para la activación del receptor. Aún queda por desarrollar alguna estrategia que permita corroborar o descartar este último modelo de inhibición, si bien dichos resultados en sentido estricto solo pueden aplicarse de manera directa a las condiciones (concentraciones) empleadas, cabe mencionar que para los tres análogos evaluados en este protocolo, fue previamente establecido el carácter de competencia con el agonista, es decir que para ejercer su efecto tienen que unirse al mismo sitio de unión del GABA, y esto fue demostrado para tres concentraciones diferentes de los análogos (IC 25, 50 y 75).

En este trabajo se mostró que la potencia de la 3-MT, la 2-PEA, el DOPAC y el HVA no depende del estado de activación del receptor GABA_{A-ρ1}; sin embargo, la eficacia

de las aminas (3-MT y 2-PEA) decae a casi la mitad cuando el receptor se encuentra activado por GABA. En la tabla 4 se sintetiza la actividad de los compuestos sobre el receptor GABA_{A-p1} en los estados evaluados (Tabla 4). Por tanto, en regiones del SNC en donde convergen el receptor GABA_{A-p1} y la vía dopaminérgica, es posible que la DA y sus metabolitos tengan algún efecto sobre la activación del receptor GABA_{A-p1}.

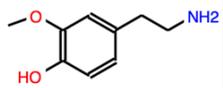
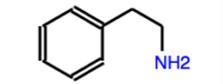
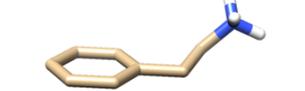
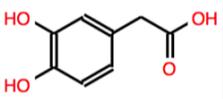
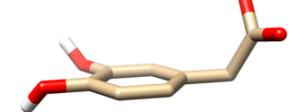
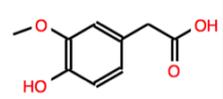
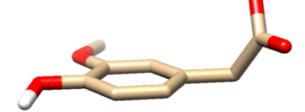
COMPUESTO	ESTRUCTURA		EFECTO SOBRE RECEPTOR GABA _{A-p1}			
			IC ₅₀ (50 mM)		EFICACIA (%)	
	2D	3D	CERRADO	ABIERTO	CERRADO	ABIERTO
3-MT			0.285	0.520	99.59	51.65
2-PEA			1.98	3.00	97.32	36.62
DOPAC			2.25	1.89	93.61	90.95
HVA			1.97	1.34	86.53	82.32

Tabla 4. Efectos de los compuestos sobre el receptor GABA_{A-p1}.

10. CONCLUSIONES.

- La adrenalina, noradrenalina y la L-DOPA no afectan las corrientes evocadas por el GABA en los receptores GABA_{A-ρ1}.
- La 3-MT, la 2-PEA, el DOPAC y el HVA inhiben las corrientes evocadas por el GABA en los receptores GABA_{A-ρ1} al unirse al sitio ortostérico.
- De estos análogos, la región de los hidroxilos tiene funciones diferenciadas entre los sustituyentes 3 y 4. El de la posición 3 funciona como un estabilizador/ orientador pasivo, y el de la posición 4 lo hace de manera activa debido a su cercanía con el glutamato de la posición 196.
- El fenilo funciona como estabilizador al interaccionar con los fenilos de las tirosinas^{102, 241}.
- Los farmacóforos son tanto la amina como el ácido.
 - A. El grupo amina evita la unión del GABA en su sitio dentro del receptor GABA_{A-ρ1} al unirse a los residuos estabilizadores del GABA. Por tanto, es posible clasificar a estas aminas como antagonistas competitivos, pero solo en el modelo de co-aplicación.
 - B. El grupo ácido al interaccionar con uno de los residuos implicados en el proceso de apertura del canal, cuando el receptor está activado, hace posible que el DOPAC y HVA, sean agonistas inversos.
- Un segundo mecanismo de acción para los grupos aminas, implica desplazar al menos una molécula de agonista y estabilizar un estado alterno de conducción del canal.

11. PERSPECTIVAS.

- Evaluar la validez del modelo de unión mediante la mutación las tirosinas 214 y 102, y el glutamato 196.
- Desarrollar una estrategia experimental que permita establecer la validez del mecanismo propuesto para las aminos en el canal activado.
- Desarrollar y evaluar moléculas cuya conformación espacial optimizada sea más cercana a la requerida en el modelo de acoplamiento virtual.
- Desarrollar una estrategia que permita determinar el efecto del microambiente *in vivo* sobre el receptor GABA_{A-p1}.

12. REFERENCIAS.

- ALAKUIJALA, A., ALAKUIJALA, J. & PASTERNAK, M. 2006. Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. *Eur J Neurosci*, 23, 514-20.
- AMIN, J. & SUBBARAYAN, M. S. 2017. Orthosteric- versus allosteric-dependent activation of the GABAA receptor requires numerically distinct subunit level rearrangements. *Sci Rep*, 7, 7770.
- BARNARD, E. A., SKOLNICK, P., OLSEN, R. W., MOHLER, H., SIEGHART, W., BIGGIO, G., BRAESTRUP, C., BATESON, A. N. & LANGER, S. Z. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev*, 50, 291-313.
- BEN-ARI, Y., GAIARSA, J. L., TYZIO, R. & KHAZIPOV, R. 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev.*, 87, 1215-84.
- BOLLER, M. & SCHMIDT, M. 2001. Postnatal maturation of GABA(A) and GABA(C) receptor function in the mammalian superior colliculus. *Eur J Neurosci*, 14, 1185-93.
- BORGHESE, C. M., HERMAN, M., SNELL, L. D., LAWRENCE, K. J., LEE, H. Y., BACKOS, D. S., VANDERLINDEN, L. A., HARRIS, R. A., ROBERTO, M., HOFFMAN, P. L. & TABAKOFF, B. 2017. Novel Molecule Exhibiting Selective Affinity for GABAA Receptor Subtypes. *Sci Rep*, 7, 6230.
- BORGHESE, C. M., RUIZ, C. I., LEE, U. S., CULLINS, M. A., BERTACCINI, E. J., TRUDELL, J. R. & HARRIS, R. A. 2016. Identification of an Inhibitory Alcohol Binding Site in GABAA rho1 Receptors. *ACS Chem Neurosci*, 7, 100-8.
- BORMANN, J. 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 16-9.
- BOUE-GRABOT, E., ROUDBARAKI, M., BASCLES, L., TRAMU, G., BLOCH, B. & GARRET, M. 1998. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem*, 70, 899-907.
- BREITINGER, H. G. 2012. "Drug Synergy" Mechanisms and Methods of Analysis, Toxicity and Drug Testing, Prof. Bill Acree (Ed.), ISBN: 978-953-51-0004-1, InTech., In: ACREE, B. (ed.) *Toxicity and Drug Testing*. InTech.
- CALVO, D. J. & MILEDI, R. 1995. Activation of GABA rho 1 receptors by glycine and beta-alanine. *Neuroreport*, 6, 1118-20.

- CARLAND, J. E., YAMAMOTO, I., HANRAHAN, J. R., ABDEL-HALIM, H., LEWIS, T. M., ABSALOM, N. & CHEBIB, M. 2015. A hydrophobic area of the GABA rho(1) receptor containing phenylalanine 124 influences both receptor activation and deactivation. *J Mol Neurosci*, 55, 305-13.
- CHEBIB, M., GAVANDE, N., WONG, K. Y., PARK, A., PREMOLI, I., MEWETT, K. N., ALLAN, R. D., DUKE, R. K., JOHNSTON, G. A. & HANRAHAN, J. R. 2009. Guanidino acids act as rho1 GABA(C) receptor antagonists. *Neurochem Res*, 34, 1704-11.
- CHEBIB, M., HINTON, T., SCHMID, K. L., BRINKWORTH, D., QIAN, H., MATOS, S., KIM, H. L., ABDEL-HALIM, H., KUMAR, R. J., JOHNSTON, G. A. & HANRAHAN, J. R. 2009b. Novel, potent, and selective GABAC antagonists inhibit myopia development and facilitate learning and memory. *J Pharmacol Exp Ther*, 328, 448-57.
- CHEBIB, M., MEWETT, K. N. & JOHNSTON, G. A. R. 1998. GABAC receptor antagonists differentiate between human p1 and p2 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol*, 357, 227-34.
- CHERUBINI, E., GAIARSA, J. L. & BEN-ARI, Y. 1991. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci*, 12, 515-9.
- DREW, C. A. & JOHNSTON, G. A. 1992. Bicuculline- and baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid binding to rat cerebellar membranes. *J. Neurochem*, 58, 1087-92.
- DUKE, R. K., CHEBIB, M., BALCAR, V. J., ALLAN, R. D., MEWETT, K. N. & JOHNSTON, G. A. 2000. (+)- and (-)-cis-2-aminomethylcyclopropanecarboxylic acids show opposite pharmacology at recombinant rho(1) and rho(2) GABA(C) receptors. *J Neurochem*, 75, 2602-10.
- ENZ, R. & CUTTING, G. R. 1998. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res*, 38, 1431-41.
- ESTRADA-MONDRAGÓN, A. 2011. Un modelo estructural por homología del dominio TM4 del neuroreceptor GABA. *Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Doctorado.*
- FARRANT, M. & NUSSER, Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*, 6, 215-29.
- FRITSCHY, J. M. & PANZANELLI, P. 2014. GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *Eur J Neurosci*, 39, 1845-65.
- GALLIVAN, J. P. & DOUGHERTY, D. A. 1999. Cation-pi interactions in structural biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9459-64.

- GAMEL-DIDELON, K., KUNZ, L., FOHR, K. J., GRATZL, M. & MAYERHOFER, A. 2003. Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells. *J Biol Chem*, 278, 20192-5.
- GAVANDE, N., YAMAMOTO, I., SALAM, N. K., AI, T. H., BURDEN, P. M., JOHNSTON, G. A., HANRAHAN, J. R. & CHEBIB, M. 2011. Novel Cyclic Phosphinic Acids as GABAC rho Receptor Antagonists: Design, Synthesis, and Pharmacology. *ACS Med Chem Lett*, 2, 11-6.
- GIBBS, M. E. & JOHNSTON, G. A. R. 2005. Opposing roles for GABAA and GABAC receptors in short-term memory formation in young chicks. *Neuroscience*, 131, 567-76.
- GOUTMAN, J. D., ESCOBAR, A. L. & CALVO, D. J. 2005. Analysis of macroscopic ionic currents mediated by GABARho1 receptors during lanthanide modulation predicts novel states controlling channel gating. *Br J Pharmacol*, 146, 1000-9.
- GOUTMAN, J. D., WAXEMBERG, M. D., DOÑATE-OLIVER, F., POMATA, P. E. & CALVO, D. J. 2003. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. *Eur J Pharmacol*, 461, 79-87.
- HANSEN, S. B., WANG, H. L., TAYLOR, P. & SINE, S. M. 2008. An ion selectivity filter in the extracellular domain of Cys-loop receptors reveals determinants for ion conductance. *J Biol Chem*, 283, 36066-70.
- HANWELL, M. D. 2012. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminf.*, 4.
- HARRISON, N. J. & LUMMIS, S. C. 2006a. Locating the carboxylate group of GABA in the homomeric rho GABA(A) receptor ligand-binding pocket. *J Biol Chem*, 281, 24455-61.
- HARRISON, N. J. & LUMMIS, S. C. 2006b. Molecular modeling of the GABA(C) receptor ligand-binding domain. *J Mol Model*, 12, 317-24.
- HARVEY, V. L., DUGUID, I. C., KRASEL, C. & STEPHENS, G. J. 2006. Evidence that GABA rho subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*, 57, 127-39.
- HEDBLUM, E. & KIRKNESS, E. F. 1997. A Novel Class of GABAA Receptor Subunit in Tissues of the Reproductive System. *The Journal of biological chemistry*, 272-76.
- HILF, R. J. & DUTZLER, R. 2009. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*, 457, 115-8.
- HIRASAWA, H., BETENSKY, R. A. & RAVIOLA, E. 2012. Corelease of dopamine and GABA by a retinal dopaminergic neuron. *J Neurosci*, 32, 13281-91.

- HIRASAWA, H., CONTINI, M. & RAVIOLA, E. 2015. Extrasynaptic release of GABA and dopamine by retinal dopaminergic neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370.
- HOERBELT, P., LINDSLEY, T. A. & FLECK, M. W. 2015. Dopamine directly modulates GABAA receptors. *J Neurosci*, 35, 3525-36.
- HUANG, S. H., LEWIS, T. M., LUMMIS, S. C., THOMPSON, A. J., CHEBIB, M., JOHNSTON, G. A. & DUKE, R. K. 2012. Mixed antagonistic effects of the ginkgolides at recombinant human rho1 GABAC receptors. *Neuropharmacology*, 63, 1127-39.
- HULL, C., LI, G. L. & VON GERSDORFF, H. 2006. GABA transporters regulate a standing GABAC receptor-mediated current at a retinal presynaptic terminal. *J Neurosci*, 26, 6979-84.
- JANSEN, M., BALI, M. & AKABAS, M. H. 2008. Modular design of Cys-loop ligand-gated ion channels: functional 5-HT3 and GABA rho1 receptors lacking the large cytoplasmic M3M4 loop. *J Gen Physiol*, 131, 137-46.
- JOHNSTON, G. A., CHEBIB, M., HANRAHAN, J. R. & MEWETT, K. N. 2010. Neurochemicals for the investigation of GABA(C) receptors. *Neurochem Res*, 35, 1970-7.
- JOHNSTON, G. A., CURTIS, D. R., BEART, P. M., GAME, C. J., MCCULLOCH, R. M. & TWITCHIN, B. 1975. Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J. Neurochem*, 24, 157-160.
- JONES, S. M. & PALMER, M. J. 2011. Pharmacological analysis of the activation and receptor properties of the tonic GABA(C)R current in retinal bipolar cell terminals. *PLoS One*, 6, e24892.
- KETTENMANN, H. & SCHACHNER, M. 1985. Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J Neurosci*, 3295-301.
- KRNJEVIĆ, K. & PHILLIS, J. W. 1963. Ionophoretic studies of neurons in the mammalian cerebral cortex. *J. Physiol.*, 274-304.
- KUSAMA, T., SPIVAK, C. E., WHITING, P., DAWSON, V. L., SCHAEFFER, J. C. & UHL, G. R. 1993. Pharmacology of GABA rho 1 and GABA alpha/beta receptors expressed in *Xenopus* oocytes and COS cells. *Br J Pharmacol*, 109, 200-6.
- LE NOVÈRE, N. & CHANGEUX, J. P. 1999. The Ligand Gated Ion Channel Database. *Nucleic Acids Res.*, 27, 340-2.

- LI, S., ZHANG, Y., LIU, H., YAN, Y. & LI, Y. 2008. Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 40, 761-7.
- LIMON, A., ESTRADA-MONDRAGÓN, A., RUIZ, J. M. & MILEDI, R. 2016. Dipicrylamine Modulates GABA ρ 1 Receptors through Interactions with Residues in the TM4 and Cys-Loop Domains. *Mol Pharmacol.*, 89, 446-56.
- LIMON, A., REYES-RUIZ, J. M., VASWANI, R. G., CHAMBERLIN, A. R. & MILEDI, R. 2010. Kaitocephalin antagonism of glutamate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *ACS Chem Neurosci*, 1, 175-181.
- LOCOCK, K. E., YAMAMOTO, I., TRAN, P., HANRAHAN, J. R., CHEBIB, M., JOHNSTON, G. A. & ALLAN, R. D. 2013. Gamma-aminobutyric acid(C) (GABAC) selective antagonists derived from the bioisosteric modification of 4-aminocyclopent-1-enecarboxylic acid: amides and hydroxamates. *J Med Chem*, 56, 5626-30.
- LUMMIS, S. C., HARRISON, N. J., WANG, J., ASHBY, J. A., MILLEN, K. S., BEENE, D. L. & DOUGHERTY, D. A. 2012. Multiple Tyrosine Residues Contribute to GABA Binding in the GABA(C) Receptor Binding Pocket. *ACS Chem Neurosci*, 3, 186-192.
- LUMMIS, S. C., MCGONIGLE, I., ASHBY, J. A. & DOUGHERTY, D. A. 2011. Two amino acid residues contribute to a cation-pi binding interaction in the binding site of an insect GABA receptor. *J Neurosci*, 31, 12371-6.
- MACDONALD, R. L. & OLSEN, R. W. 1994. GABAA receptor channels. *annu rev neurosci*, 17, 569-602.
- MADSEN, C., JENSEN, A. A., LILJEFORS, T., KRISTIANSEN, U., NIELSEN, B., HANSEN, C. P., LARSEN, M., EBERT, B., BANG-ANDERSEN, B., KROGSGAARD-LARSEN, P. & BENTE, F. 2007. 5-Substituted Imidazole-4-acetic Acid Analogues: Synthesis, Modeling, and Pharmacological Characterization of a Series of Novel γ -Aminobutyric AcidC Receptor Agonists *J. Med. Chem.*, 50, 4147-4161.
- MARTINEZ-DELGADO, G., ESTRADA-MONDRAGON, A., MILEDI, R. & MARTINEZ-TORRES, A. 2010. An Update on GABA Receptors. *Current Neuropharmacology*, 8, 422-433.
- MARTINEZ-TORRES, A., DEMURO, A. & MILEDI, R. 2000. GABA ρ 1/GABAA α 1 receptor chimeras to study receptor desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3562-6.

- MATSUI, K., HASEGAWA, J. & TACHIBANA, M. 2001. Modulation of excitatory synaptic transmission by GABA(C) receptor-mediated feedback in the mouse inner retina. *J Neurophysiol*, 86, 2285-98.
- MEJÍA, C., GARCÍA-ALCOCER, G., BERUMEN, L. C., ROSAS-ARELLANO, A., MILEDI, R. & MARTÍNEZ-TORRES, A. 2008. Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development. *Neurosci Lett*, 432, 1-6.
- MELIS, C., LUMMIS, S. C. & MOLTENI, C. 2008. Molecular dynamics simulations of GABA binding to the GABAC receptor: the role of Arg104. *Biophys J*, 95, 4115-23.
- MILEDI, R., PARKER, I. & SUMIKAWA, K. 1982. Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc. Roy. Soc. Lond. Biol. Sci.*, 216, 509-515.
- MILLER, P. S. & ARICESCU, A. R. 2014. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature*, 512, 270-5.
- MURATA, Y., WOODWARD, R. M., MILEDI, R. & OVERMAN, L. E. 1996. The first selective antagonist for a GABAC receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 6, 2073–2076.
- NAFFAA, M. M., ABSALOM, N., SOLOMON, V. R., CHEBIB, M., HIBBS, D. E. & HANRAHAN, J. R. 2016. Investigating the Role of Loop C Hydrophilic Residue 'T244' in the Binding Site of rho1 GABAC Receptors via Site Mutation and Partial Agonism. *PLoS One*, 11, e0156618.
- NAFFAA, M. M., HUNG, S., CHEBIB, M., JOHNSTON, G. A. R. & HANRAHAN, J. R. 2017. GABA-rho receptors: distinctive functions and molecular pharmacology. *Br J Pharmacol*, 174, 1881-1894.
- NEMECZ, A., PREVOST, M. S., MENNY, A. & CORRINGER, P. J. 2016. Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron*, 90, 452-70.
- NGUYEN, Q. A. & NICOLL, R. A. 2018. The GABAA Receptor β Subunit Is Required for Inhibitory Transmission. *Neuron*, 98, 718-25.
- NUTT, D. J. 2006. GABAA Receptors: Subtypes, Regional Distribution, and Function. *J Clin Sleep Med*. 2, 6-11.
- NUTT, D. J. & MALIZIA, A. L. 2001. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br J Psychiatry.*, 179:.
- O'MARA, M., CROMER, B., PARKER, M. & CHUNG, S. H. 2005. Homology model of the GABAA receptor examined using Brownian dynamics. *Biophys J*, 88, 3286-99.
- OCHOA-DE LA PAZ, L. D., ESTRADA-MONDRAGON, A., LIMON, A., MILEDI, R. & MARTINEZ-TORRES, A. 2012. Dopamine and serotonin modulate human

- GABA ρ 1 receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *ACS Chem Neurosci*, 3, 96-104.
- OCHOA-DE LA PAZ, L. D., MARTÍNEZ-DÁVILA, I. A., MILEDI, R. & MARTÍNEZ-TORRES, A. 2008. Modulation of human GABA ρ 1 receptors by taurine. *Neurosci Res*, 61, 302-8.
- OLSEN, R. W. 2014. Analysis of gamma-aminobutyric acid (GABA) type A receptor subtypes using isosteric and allosteric ligands. *Neurochem Res*, 39, 1924-41.
- OLSEN, R. W. & SIEGHART, W. 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56, 141-8.
- OSOLODKIN, D. I., CHUPAKHIN, V. I., PALYULIN, V. A. & ZEFIROV, N. S. 2009. Molecular modeling of ligand-receptor interactions in GABA C receptor. *J Mol Graph Model*, 27, 813-21.
- PETERS, J. A., COOPER, M. A., CARLAND, J. E., LIVESEY, M. R., HALES, T. G. & LAMBERT, J. J. 2010. Novel structural determinants of single channel conductance and ion selectivity in 5-hydroxytryptamine type 3 and nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol*, 588, 587-96.
- PETRIZ, A., REYES-HARO, D., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M. A., MILEDI, R. & MARTÍNEZ-TORRES, A. 2014. GABA ρ subunits confer a bicuculline-insensitive component to GFAP+ cells of cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, 17522-7.
- PETTERSEN, E. F. 2004. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.*, 25, 1605-12.
- POLENZANI, L., WOODWARD, R. M. & MILEDI, R. 1991. Expression of mammalian γ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4318-22.
- PUTHENKALAM, R., HIECKEL, M., SIMEONE, X., SUWATTANASOPHON, C., FELDBAUER, R. M., ECKER, G. F. & ERNST, M. 2016. Structural Studies of GABAA Receptor Binding Sites: Which Experimental Structure Tells us What? *Front. Mol. Neurosci*, 44-48.
- RAGOZZINO, D., WOODWARD, R. M., MURATA, Y., EUSEBI, F., OVERMAN, L. E. & MILEDI, R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acidC receptor antagonist. *Molecular Pharmacology*, 50, 1024-30.
- REIS, G. M. & DUARTE, I. D. 2007. Involvement of chloride channel coupled GABAC receptors in the peripheral antinociceptive effect induced by GABAC receptor agonist cis-4-aminocrotonic acid. *Life Sci*, 80, 1268-73.

- REYES-HARO, D., CABRERA-RUIZ, E., ESTRADA-MONDRAGON, A., MILEDI, R. & MARTINEZ-TORRES, A. 2014. Modulation of GABA-A receptors of astrocytes and STC-1 cells by taurine structural analogs. *Amino Acids*, 46, 2587-93.
- REYES-RUIZ, J. M., LIMON, A. & MILEDI, R. 2014. Cloning and characterization of the ionotropic GABA receptor subunit rho1 from pig (*Sus scrofa*). *Neurosci Lett*, 558, 78-81.
- ROSAS-ARELLANO, A., .D., O.-D. L. P., MILEDI, R. & MARTÍNEZ-TORRES, A. 2007. Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA rho1 receptor. *Neurosci Res*, 57, 347-53.
- ROSAS-ARELLANO, A., MACHUCA-PARRA, A. I., REYES-HARO, D., MILEDI, R. & MARTINEZ-TORRES, A. 2012. Expression of GABA_A receptors in the neostriatum: Localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP-positive cells. *J. Neurochem*, 122, 900-10.
- ROSAS-ARELLANO, A., PARODI, J., MACHUCA-PARRA, A. I., SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, A., INESTROSA, N. C., MILEDI, R. & MARTÍNEZ-TORRES, A. 2011. The GABA(A)_ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. *Neurosci Lett*, 500, 20-25.
- ROZZO, A., ARMELLIN, M., FRANZOT, J., CHIARUTTINI, C., NISTRI, A. & TONGIORGI, E. 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABA_C receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*, 15, 1747-58.
- SALAZAR, H., EIBL, C., CHEBLI, M. & PLESTED, A. 2017. Mechanism of partial agonism in AMPA-type glutamate receptors. *Nat Commun*, 8, 14327-30.
- SCHLICKER, K., BOLLER, M. & SCHMIDT, M. 2004. GABA_C receptor mediated inhibition in acutely isolated neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res Bull*, 63, 91-7.
- SEDELNIKOVA, A., SMITH, C. D., ZAKHARKIN, S. O., DAVIS, D., WEISS, D. S. & CHANG, Y. 2005. Mapping the rho1 GABA(C) receptor agonist binding pocket. Constructing a complete model. *J Biol Chem*, 280, 1535-42.
- SIGEL, E. & STEINMANN, M. E. 2012. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem*, 287, 40224-31.
- STEPHEN, P. H. A., JOHN, A. P., EAMONN, K., NEIL, M., HELEN, E. B., FACCENDA, E., PAWSON, A., SHARMAN, J., SOUTHAN, C. & DAVIES, J. 2015. The concise guide to pharmacology 2015/16: Ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol*, 172, 5870–903.

- TROTT, O. & OLSON, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput Chem.*, 30, 455-61.
- VERDOORN, T. A., KLECKNER, N. W. & DINGLEDINE, R. 1998. N-methyl-D-aspartate/glycine and quisqualate/kainate receptors expressed in *Xenopus* oocytes: antagonist pharmacology. *Mol Pharmacol.*, 35, 360-8.
- VIEN, J., DUKE, R. K., MEWETT, K. N., JOHNSTON, G. A., SHINGAI, R. & CHEBIB, M. 2002. trans-4-Amino-2-methylbut-2-enoic acid (2-MeTACA) and (+/-)-trans-2-aminomethylcyclopropanecarboxylic acid ((+/-)-TAMP) can differentiate rat rho3 from human rho1 and rho2 recombinant GABA(C) receptors. *Br J Pharmacol*, 135, 883-90.
- WANG, T.-L., HACKAM, A., GUGGINO, W. B. & CUTTING, W. B. 1995. A Single Histidine Residue Is Essential for Zinc Inhibition of GABA_A Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 1995, 7684-91.
- WHITING, P. 2003. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today*, 8, 445-50.
- XIE, R. & MANIS, P. B. 2013. Target-specific IPSC kinetics promote temporal processing in auditory parallel pathways. *J. Neurosci.*, 33, 1598-614.
- XU, J. Y., YANG, B. & SASTRY, B. R. 2009. The involvement of GABA-C receptors in paired-pulse depression of inhibitory postsynaptic currents in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Exp Neurol*, 216, 243-6.
- YAMAMOTO, I., CARLAND, J. E., LOCOCK, K., GAVANDE, N., ABSALOM, N., HANRAHAN, J. R., ALLAN, R. D., JOHNSTON, G. A. & CHEBIB, M. 2012. Structurally diverse GABA antagonists interact differently with open and closed conformational states of the rho1 receptor. *ACS Chem Neurosci*, 3, 293-301.
- YLILAURI, M. & PENTIKÄINEN, O. T. 2012. Structural Mechanism of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Type 1 Partial Agonism. *PLoS ONE*, 7.
- ZHU, Y., RIPPS, H. & QIAN, H. 2007. A single amino acid in the second transmembrane domain of GABA rho receptors regulates channel conductance. *Neurosci Lett*, 418, 205-9.