



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

**“Inhibición de la potenciación del receptor de glicina por etanol utilizando péptidos y moléculas pequeñas que se unen al dímero  $G\beta\gamma$  en modelos in vitro e in vivo”**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

LORETO SOLEDAD SAN MARTÍN VÁSQUEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2016

Profesores Guías: Dr. José Leonardo Guzmán González  
Dr. Luis Aguayo Hernández  
Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. José Leonardo Guzmán González  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Luis Aguayo Hernández  
Profesor Co-Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas



---

Dr. Marcela Torrejón Quezada  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Miguel Reyes Parada  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de Santiago

---

Dr. Juan Pablo Henríquez H.  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

## AGRADECIMIENTOS

“But mouse-friend, you are not alone  
in proving foresight may be vain:  
the best-laid schemes of Mice and Men  
go often awry, and leave us only grief and pain,  
for promised joy!”

### **To a Mouse - Robert Burns**

En las siguientes dos páginas quisiera dedicar algunas líneas agradeciendo a todos quienes han contribuido de alguna forma durante mis estudios en el programa de doctorado.

Primero quiero partir por agradecer a mi familia, a Benito y Yolanda, mis padres y a mis hermanas, quienes me han apoyado en forma incondicional en cada una de mis etapas durante mi formación académica, científica y profesional.

Me gustaría agradecer además a los miembros que conformaron mi comisión evaluadora de tesis, a la Dra. Marcela Torrejón, al Dr. Gonzalo Yévenes y al Dr. Miguel Reyes por los consejos y por haber contribuido a mejorar este trabajo de tesis. De igual forma quisiera agradecer la colaboración del Dr. Chunyang Jin al donar los compuestos usados en este trabajo, y a la Dra. Mia Ericson por haberme recibido en su laboratorio en Gotemburgo, Suecia.

De forma particular quiero agradecer a mis profesores tutores, el Dr. Leonardo Guzmán y Dr. Luis Aguayo, por su paciencia y sus sabios consejos que me brindaron durante mi trabajo en el laboratorio de Neurofisiología, los cuales sin duda contribuyeron a mi formación en todos estos años.

Durante todos estos años tuve la fortuna de conocer personas muy especiales que han pasado por el laboratorio de Neurofisiología que no sólo contribuyeron con el trabajo experimental sino a hacer mucho más agradable la estadía en este

laboratorio. Debo agradecer de manera especial a los integrantes que han conformado el grupo “Los Leoncitos”, especialmente a Daniela N, Daniela G (“las danis”), Luchón, Tania, Fabian-cito, así como también a otros integrantes que han sido parte del laboratorio de Neurofisiología, especialmente a Cesarín, Scarlet, Pablo, Cakay, Ale Ramírez, María Paz, Andrea Sánchez, Carlos Felipe. Además me gustaría agradecer a Laurie Aguayo por su buena disponibilidad y paciencia a ayudarnos siempre en asuntos del laboratorio o a corregir el inglés de nuestros resúmenes y publicaciones.

Me gustaría agradecer en forma muy especial a Gonzalo, quien me ha acompañado y apoyado en esta última etapa de mis estudios de doctorado, cuya presencia ha sido fundamental para enfrentar los momentos buenos y malos durante la fase final de esta tesis, subiéndome el ánimo en los momentos en que el estrés me ganaba. Agradecer su cariño, compañía, apoyo, alegría y sentido del humor que me entrega día a día, sin dejar de mencionar los tecitos que compartimos acompañados de una buena conversación.

Finalmente quisiera agradecer a quienes contribuyeron económicamente durante estos años en mis estudios de doctorado y al desarrollo de esta tesis. Agradecer a la beca de Doctorado Nacional CONICYT, así como también a los proyectos FONDECYT 1131004, IDeA FONDEF CA12i10280 y NIH RO1 AA15150. También quisiera agradecer a CONICYT y la escuela de Graduados de la Universidad de Concepción por el apoyo económico brindado para realizar pasantías y asistir a eventos en el extranjero.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
LISTA DE ABREVIACIONES .....	9
RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	14
1. INTRODUCCIÓN .....	16
1.1 Relevancia fisiológica y farmacológica del GlyR.....	17
1.2 Modulación del GlyR por etanol.....	21
1.3 Péptidos pequeños como herramienta farmacológica .....	27
1.4 Inhibición de la señalización de Gβγ mediante péptidos y moléculas pequeñas .....	29
1.5 Inhibición del efecto de etanol sobre el GlyR usando péptidos pequeños que se unen a Gβγ.....	32
1.6 Búsqueda mediante screening virtual de moléculas pequeñas que se unen a Gβγ .....	38
HIPÓTESIS .....	42
OBJETIVOS .....	43
Objetivo General .....	43
Objetivo Específico 1 .....	43
Objetivo Específico 2 .....	43
2. MATERIALES Y MÉTODO.....	45
2.1 GENERALIDADES .....	45
2.1.1 Cultivo celular:.....	45

2.1.2 Transfección.....	45
2.1.3 Animales .....	45
2.1.4 Docking Molecular.....	46
2.2 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	47
2.2.1 Electrofisiología.....	47
2.2.2 Corrientes mediadas por GlyR.....	48
2.2.3 Modulación tónica mediada por GlyRs.....	49
2.2.4 Corrientes sinápticas espontáneas glicinérgicas.....	49
2.2.5 Corrientes mediadas por canales GIRK.....	49
2.2.6 Liberación de Ca <sup>2+</sup> intracelular mediado por PLC $\square$ .....	50
2.2.7 Viabilidad celular .....	51
2.2.8 Inmunocitoquímica .....	51
2.3 ESTUDIOS EN ANIMALES: ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO.....	52
2.3.1 LORR (Loss of the Righting Reflex: pérdida del reflejo de enderezamiento) .....	52
2.3.2 Rotarod acelerado.....	53
2.3.3 Open Field.....	54
2.3.4 Metabolismo de etanol .....	55
2.4 ESTUDIOS EN ANIMALES: MICRODIÁLISIS <i>IN VIVO</i> .....	55
2.4.1 Implantación cánula en núcleo accumbens (nAc) .....	55
2.4.2 Microdiálisis in vivo.....	55
2.4.3 Análisis de datos .....	57
3. RESULTADOS .....	58
3.1 Péptido pequeño RQHc7 como inhibidor de la potenciación por etanol de GlyRs sinápticos .....	58

3.1.1 Efecto del péptido RQHc7 en corrientes postsinápticas glicinérgicas espontáneas en presencia de etanol. ....	59
3.1.1.1 Péptidos pequeños no interfieren con la vía de señalización GIRK-G $\beta\gamma$ , ni altera la activación de PLC $\beta$ 2 mediada por G $\beta\gamma$ . ....	62
3.1.2 Ubicación celular y distribución del péptido RQHc7 .....	68
3.1.3 Mutaciones en residuos importantes en G $\beta$ altera la modulación tónica inducida por sobreexpresión del dímero G $\beta_1\gamma_2$ en GlyR .....	71
3.2 Identificación de moléculas pequeñas inhibitoras de la potenciación del GlyR por etanol.....	74
3.2.1 Las moléculas pequeñas M554 y M890 inhiben la potenciación por etanol del GlyR.....	77
3.2.1.1 Las moléculas pequeñas M554 y M890 interaccionan con G $\beta$ a través de residuos de ácido aspártico .....	80
3.2.1.2 Las moléculas pequeñas M554 y M890 atraviesan la membrana plasmática de manera limitada .....	82
3.2.1.3 Efecto de M554 y M890 sobre los parámetros de corrientes glicinérgicas modificadas por etanol .....	84
3.2.1.4 Moléculas pequeñas interfieren con la vía de señalización GIRK-G $\beta\gamma$ , pero no altera la activación de PLC $\beta$ 2 mediada por G $\beta\gamma$ . ....	88
3.2.1.5 Efecto de M119 en la potenciación del GlyR por etanol .....	93
3.2.2 Modificación de grupos químicos en M554 y M890 interfiere con su efecto inhibitorio .....	95
3.2.2.1 Análogos de M554 disminuyen la potenciación del GlyR por etanol .....	96
3.2.2.2 Enantiómeros activos de M554 y M890 .....	102
3.2.2.3 Viabilidad celular no es afectada en presencia de las distintas moléculas estudiadas .....	105

3.2.3 Molécula M554 revierte los efectos depresores de altas concentraciones de etanol <i>in vivo</i> .	107
3.2.3.1 M554 y M890 no revierten los efectos que etanol produce en actividad motora.	108
3.2.3.2 La recuperación de la coordinación motora en ensayos de rotarod es más rápida en presencia de M554.	111
3.2.3.3 Ratones C57BL/6J inyectados con M554 se recuperan más rápido en ensayos de LORR	113
3.2.3.4 Molécula M554 no altera los niveles de etanol en sangre	116
3.2.4 Molécula M554 aumenta los niveles de dopamina en nAc.	118
3.2.4.1 Molécula M554 aumenta los niveles de dopamina en nAc mediante un mecanismo que involucra al GlyR	118
3.2.4.2 La aplicación sistémica de M554 no aumenta los niveles de DA en nAc de ratas	122
4. DISCUSIÓN	124
4.1 Péptido RQHc7 es un inhibidor del efecto de etanol en GlyRs sinápticos.	125
4.2 Búsqueda de moléculas pequeñas con potencial farmacológico.	128
4.3 Toxicidad celular y solubilidad de moléculas pequeñas	132
4.4 Reversión de los efectos de etanol en comportamiento animal mediante moléculas pequeñas.	134
4.5 M554 como potencial compuesto para estudios de consumo y preferencia de alcohol	138
CONCLUSIONES.	144
REFERENCIAS.	145

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de la estructura de canales iónicos activados por ligando (LGIC) del tipo Cys-loop. ....	20
Figura 2. Modelo para la modulación por etanol del GlyR.....	25
Figura 3. Bloqueo de la potenciación del GlyR por etanol por péptidos pequeños. ....	37
Figura 4. Zona de interacción entre el dímero $G\beta\gamma$ y el péptido RQHc7.....	41
Figura 5. Esquema esquemático del ensayo de LORR.....	53
Figura 6. Figura esquemática del protocolo usado en rotarod acelerado.....	54
Figura 7. Figura esquemática de los estudios de determinación de niveles de dopamina extracelular en nAc de ratas. ....	57
Figura 8. Inhibición de los efectos de etanol en la constante de tiempo de decaimiento por péptidos pequeños.....	61
Figura 9. Activación de PLC $\beta$ 2 mediado por $G\beta\gamma$ .....	64
Figura 10. Efecto del péptido RQHc7 en la activación de GIRK mediada por $G\beta\gamma$ . ....	67
Figura 11. Ubicación celular y distribución del péptido RQHc7 en células HEK293. ....	70
Figura 12. Curva concentración-respuesta obtenida de GlyR $\alpha_1$ en respuesta a la sobreexpresión de $G\beta_1\gamma_2$ silvestre y mutado. ....	73
Figura 13. Estructura bidimensional de 6 moléculas obtenidas mediante screening virtual.....	76
Figura 14. Sensibilidad a etanol de $\alpha_1$ GlyR en presencia de moléculas pequeñas obtenidas mediante screening virtual. ....	79
Figura 15. Modelo de unión e interacción entre las moléculas seleccionadas y la superficie de $G\beta\gamma$ .....	81
Figura 16. Efecto de M554 y M890 aplicado extracelularmente en células HEK293. ....	83
Figura 17. Efecto de M554 y M890 en mIPSC glicinérgicas de neuronas espinales en cultivo. ....	86

Figura 18. Inhibición de los efectos sinápticos de etanol por las moléculas M554 y M890. ....	87
Figura 19. Activación de PLCβ2 activado por Gβγ.....	90
Figura 20. Moléculas pequeñas inhiben la activación mediada por Gβγ de canales de tipo GIRK.....	92
Figura 21. Efecto de M119 en la potenciación del GlyR por etanol.....	94
Figura 22. Representación en dos dimensiones de análogos de M554 y M890 (ChemAxon, 2013). ....	97
Figura 23. Análogos de M554 inhiben la potenciación del GlyR por etanol. ....	99
Figura 24. Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de moléculas pequeñas en la potenciación por etanol de GlyRs. ....	101
Figura 25. Representación en dos dimensiones de los enantiómeros de M554 y M890. ....	103
Figura 26. Efecto de diferentes enantiómeros de M554 y M890 en la potenciación del GlyR por etanol.....	104
Figura 27. Moléculas pequeñas no afectan la viabilidad celular.....	106
Figura 28. Efecto de las moléculas M554 y M890 en ensayos de open field en presencia de etanol. ....	110
Figura 29. La molécula M554 atenúa los efectos sedantes de alcohol en ensayos de rotarod acelerado. ....	112
Figura 30. M554 inhibe los efectos depresores de altas dosis de etanol en ensayos de pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR). ....	114
Figura 31. Efecto de M554 en ensayos de LORR en ratones KI.....	115
Figura 32. Concentración de etanol en sangre.....	116
Figura 33. Niveles de dopamina extracelular en nAc usando microdiálisis <i>in vivo</i> después de perfusión de M554 o etanol. ....	120
Figura 34. Efecto de estricnina sobre los niveles de dopamina en nAc. ....	121
Figura 35. Niveles extracelulares de dopamina en nAc después de administración sistémica de M554 o etanol.....	123

Figura 36. Figura esquemática simplificada de los participantes más importantes que median la activación inducida por etanol del sistema dopaminérgico mesolímbico. .... 141



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nombre IUPAC y puntaje de docking de las moléculas obtenidas mediante screening virtual.....	75
Tabla 2. Nombres IUPAC de análogos de M554 y M890.....	96



## LISTA DE ABREVIACIONES

$\beta$ ARK1.....	Quinasa del Receptor $\beta$ Adrenérgico 1
5-HT <sub>3</sub> -R.....	Receptor de serotonina tipo 3
AC.....	Adenilil Ciclasa
ANOVA.....	Análisis de varianza
ATP.....	Adenosina 5'fosfato
BAPTA.....	1,2- ácido bis( $\sigma$ -aminofenoxi) etano- <i>N,N,N,N</i> -tetraacético
BSA.....	Albúmina de suero de bovino
CaCl <sub>2</sub> .....	Cloruro de Calcio
Cl <sup>-</sup> .....	Ion Cloruro
CsCl.....	Cloruro de Cesio
ct- $\beta$ ARK.....	Región carboxilo terminal de la quinasa del receptor $\beta$ -adrenergico
DA.....	Dopamina
DC.....	Dominio citoplasmático
DIV.....	Días <i>in vitro</i>
EDTA.....	Ácido etilendiamintetraacético
EC <sub>10</sub> .....	Concentración agonista correspondiente al 10% efecto máximo
EC <sub>50</sub> .....	Concentración agonista correspondiente al 50% efecto máximo
G $\alpha$ i.....	Subunidad $\alpha$ inhibitoria de la proteína G
G $\beta\gamma$ .....	Heterodímero formado por las subunidades $\beta$ y $\gamma$ de la proteína G
G $\Omega$ .....	GigaOhm
GABA <sub>A</sub> -R.....	Receptor GABA <sub>A</sub> ionotrópico

GABA <sub>B</sub> -R.....	Receptor GABA <sub>B</sub> metabotrópico
GFP.....	Proteína fluorescente verde
GIRK.....	Canales de potasio de rectificación interna activados por proteína G
GPCR.....	Receptor acoplado a proteína G
GST.....	Glutación S-Transferasa
GST-X.....	Proteína de Fusión unida a GST
GTP.....	Guanosina 5'trifosfato
GlyR.....	Receptor de glicina
HEK293.....	Células embrionarias de riñon humano
HEPES.....	Ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etano-sulfónico
I <sub>glicina</sub> .....	Corrientes evocadas de glicina
I <sub>max</sub> .....	Corriente máxima
IPTG.....	Isopropiltiogalactósido
KCl.....	Cloruro de potasio
kDa.....	kilodáltons
KI.....	Knock-in
LGIC.....	Canales iónicos activados por ligando
MΩ.....	MegaOhm
min.....	Minutos
mg.....	Miligramos
MgCl <sub>2</sub> .....	Cloruro de magnesio
ml.....	mililitros
mM.....	Milimolar
ms.....	Milisegundos

nAc.....	núcleo accumbens
NaCl.....	Cloruro de sodio
nACh-R.....	Receptor de acetilcolina de tipo nicotínico
NCI.....	National Cancer Institute
ng.....	Nanogramos
NIH.....	National Institute of Health
pA.....	picoAmperios
PBS.....	Buffer fosfato salino
PI3K.....	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA.....	Proteína quinasa A
PKC.....	Proteína quinasa C
PLC.....	Fosfolipasa C
RQH.....	Péptido derivado del extremo N-terminal de dominio citoplasmático del receptor de glicina
s.....	Segundos
SDS-PAGE.....	Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio
SNC.....	Sistema nervioso central
VGCC.....	Canales de calcio activados por voltaje
TM.....	Región Transmembrana
μg.....	Microgramos
μl.....	Microlitros
μM.....	Micromolar

## RESUMEN

Etanol es la droga de abuso más usada en el mundo y socialmente aceptada a dosis moderadas. Es bastante tóxica a altas dosis, produciendo depresión respiratoria y muerte. Los efectos que produce etanol en el sistema nervioso central (SNC) ha sido tema de estudio desde muchos años. Está bien establecido que etanol potencia la actividad del receptor de glicina (GlyR), lo que se ha asociado con la reducción en la coordinación motora y ritmo respiratorio presentada durante una intoxicación aguda por este alcohol, además de estar implicado en consumo voluntario y la búsqueda de etanol.

Estudios previos de nuestro laboratorio han determinado que etanol ejerce sus efectos sobre el GlyR mediante un mecanismo que involucra a la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G, donde esta proteína interactúa directamente con aminoácidos básicos presentes en el loop intracelular (IL) del GlyR. En base a estos antecedentes, se propone que la **interferencia de la interacción entre el dímero  $G\beta\gamma$  y el GlyR utilizando péptidos y moléculas pequeñas tendrá efectos sobre las alteraciones inducidas por etanol *in vitro* e *in vivo***. A partir de esto, en nuestro laboratorio se generó previamente un péptido, denominado RQHc7 (RFRRKRR), derivado de la región amino-terminal del IL del GlyR el cual es capaz de interferir con la interacción  $G\beta\gamma$ -GlyR e inhibir la potenciación por etanol del GlyR. En el presente trabajo se encontró que el péptido RQHc7 fue efectivo en modelos de transmisión sináptica, debido a que inhibió el aumento inducido por etanol de la constante de tiempo de decaimiento de las corrientes glicinérgicas en

neuronas espinales en cultivo. Por otro lado, el péptido RQHc7 mostró selectividad, ya que no interfirió con la activación mediada por  $G\beta\gamma$  tanto de canales GIRK, como de  $PLC\beta 2$ .

A través de un screening virtual basado en la interacción del péptido RQHc7 con el dímero  $G\beta\gamma$  y utilizando una biblioteca de moléculas pequeñas (ZINC), se había identificado previamente un conjunto de compuestos con potencial farmacológico capaz de unirse a este sitio de unión en  $G\beta$ . En el presente trabajo, mediante estudios de electrofisiología, se identificaron las moléculas M554 (un derivado indol) y M890 (un derivado urea), las cuales inhibieron la potenciación del GlyR por etanol en células HEK293 e inhibieron la potenciación por etanol de la constante de tiempo de decaimiento en corrientes glicinérgicas sinápticas en neuronas espinales en cultivo. Cuando se realizaron ensayos de comportamiento animal usando estos dos compuestos, se encontró que M554 fue capaz de revertir los efectos de altas dosis de etanol en ensayos de rotarod acelerado y ensayos de pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR) en ratones C57BL/6J. Adicionalmente se demostró que M554 es capaz de elevar los niveles de dopamina en núcleo accumbens (nAc) de ratas Wistar a través de un mecanismo que involucra a los GlyRs.

En resumen, los resultados de este estudio proporcionan información que puede ser útil en el diseño de moléculas terapéuticas para el tratamiento de las complicaciones derivadas de la intoxicación aguda y abuso por etanol.

## ABSTRACT

Ethanol is the most used drug of abuse in the world and socially accepted in moderate doses. It is quite toxic at high doses, producing respiratory depression and death. The effects of ethanol in the central nervous system (CNS) have been studied for several years. It is well established that ethanol enhances glycine receptor (GlyR) activity, which is associated to a reduction in motor coordination and respiratory rhythm, presented in acute alcohol intoxication, as well as its implication in voluntary alcohol intake and alcohol-seeking behavior.

Preliminary studies from our laboratory have shown that ethanol exerts its effects on the GlyR by a mechanism which involves the  $\beta\gamma$  subunit of G proteins, where this protein interacts directly with basic amino acids from the intracellular loop (IL) of the GlyR. Based on this, it has been proposed that interference between the  $G\beta\gamma$  dimer and GlyR using peptides and small molecules will have effects on alterations induced by ethanol *in vitro* and *in vivo*. Therefore, we generated a peptide named RQHc7 (RFRRKRR) derived from the intracellular loop of the GlyR amino-terminal region that is capable of inhibiting the interaction between  $G\beta\gamma$  and GlyR, thus inhibiting ethanol-induced GlyR potentiation. In this study, it was found that the RQHc7 peptide was effective in synaptic transmission models because it inhibited the potentiation induced by ethanol on the time decay constant of glycinergic currents in spinal cord neurons. On the other hand, the RQHc7 peptide showed selectivity because it did not interfere with the  $G\beta\gamma$ -dependent activation of GIRK channels and PLC $\beta$ 2.

Through a virtual screening study based on the interaction between the RQHc7 peptide and the G $\beta$  $\gamma$  dimer, and using a small molecule library (ZINC), a group of compounds with pharmacological potential capable of binding to this binding site in G $\beta$  was identified. In the present study, using electrophysiological techniques, the molecules M554 (an indole derivative) and M890 (a urea derivative) were found to inhibit the ethanol-induced enhancement of glycine-evoked currents in GlyRs in HEK293 cells, and also inhibit the ethanol-induced potentiation of the time decay constant in glycinergic synaptic currents in spinal cord neurons. When animal behavior assays were done using these two compounds, it was found that M554 was capable of reversing the effects of high doses of ethanol in rotarod assays and loss of righting reflex (LORR) assays in C57BL/6J mice. Additionally, it was shown that M554 was capable of increasing dopamine levels in the nucleus accumbens (nAc) of Wistar rats by a mechanism that involves GlyRs.

In summary, the results of this study provide information that can be useful in therapeutic molecular design for the treatment of complications by acute alcohol intoxication and abuse disorders.

## 1. INTRODUCCIÓN

El etanol es una droga ampliamente utilizada desde tiempos remotos, actuando como un depresor del sistema nervioso central (SNC). Esto ha transformado su consumo en una problemática biomédica, de salud pública y económica. Por un lado, el consumo agudo de dosis intoxicantes de etanol produce cambios rápidos en distintas funciones del sistema nervioso central que pueden llevar a un paro respiratorio y cardiovascular que conducen a condiciones que amenazan con la vida del individuo. Por otro lado, su uso crónico está asociado a la conducta de búsqueda de alcohol, consumo periódico y compulsivo, tolerancia y todo el impacto psicosocial del consumo excesivo de alcohol (Vonghia et al. 2008; Spanagel 2009). Los tratamientos que buscan reducir las complicaciones del abuso del alcohol, tanto agudo como crónico, se enfrentan a retos importantes incluyendo adherencia al tratamiento, la reducida eficacia de la droga disponible, y los efectos secundarios indeseados. Las actuales terapias farmacológicas se centran en la adicción e incluyen acamprosato para reducir el deseo de consumo, disulfiram para la aversión al alcohol y naltrexona para reducir la experiencia placentera de etanol (Mann 2004; Hillemecher et al. 2011). Sin embargo, estos agentes tienen efectos adversos importantes y no son efectivos en prevenir la muerte por intoxicación aguda por alcohol y la recaída en su consumo.

A pesar de ser una droga de uso habitual, poco se conoce sobre el mecanismo exacto de acción que lleva a las distintas manifestaciones experimentadas por un individuo que abusa del consumo de alcohol. Sin embargo,

se han ido dilucidando distintos mecanismos que permitirían explicar estos efectos. Inicialmente se manejó una hipótesis que involucraba un mecanismo inespecífico relacionado con alteraciones en las propiedades físico-químicas de las membranas celulares (fluidez, tensión, volumen). No obstante, esta hipótesis ha sido prácticamente desechada debido a que distintos estudios han indicado que concentraciones farmacológicas relevantes de este alcohol no alteran las propiedades de la membrana celular (Peoples, Li, and Weight 1996). Posteriormente, se puso especial interés en distintas proteínas de señalización intracelular como blancos para etanol, en donde se ha encontrado que proteínas como adenilil ciclasas (Bode and Molinoff 1988) serían moduladas por etanol. Sin embargo, debido a que los efectos de los depresores del sistema nervioso central son rápidos, se ha sugerido fuertemente que uno de sus blancos principales serían los canales iónicos activados por ligando (LGICs), en donde etanol estaría modulando positiva o negativamente a los miembros de esta familia (Harris 1999).

Uno de los LGICs más estudiado en cuanto a los efectos depresores que etanol tiene sobre el SNC, es el receptor de glicina (GlyR), un receptor del tipo inhibitorio perteneciente a la familia Cys-loop (Aguayo and Pancetti 1994; Mascia et al. 1998; Harris 1999).

### **1.1 Relevancia fisiológica y farmacológica del GlyR**

Glicina es el neurotransmisor inhibitorio más importante en la médula espinal y en el tallo cerebral de los mamíferos. La unión de glicina con su receptor induce un incremento rápido de la conductancia iónica del Cl<sup>-</sup> generando

hiperpolarización de la membrana celular. En neuronas, la acción inhibitoria del GlyR regula diversas funciones fisiológicas importantes, tales como la transmisión del dolor, coordinación motora, control respiratorio y desarrollo neuronal (Lynch 2004).

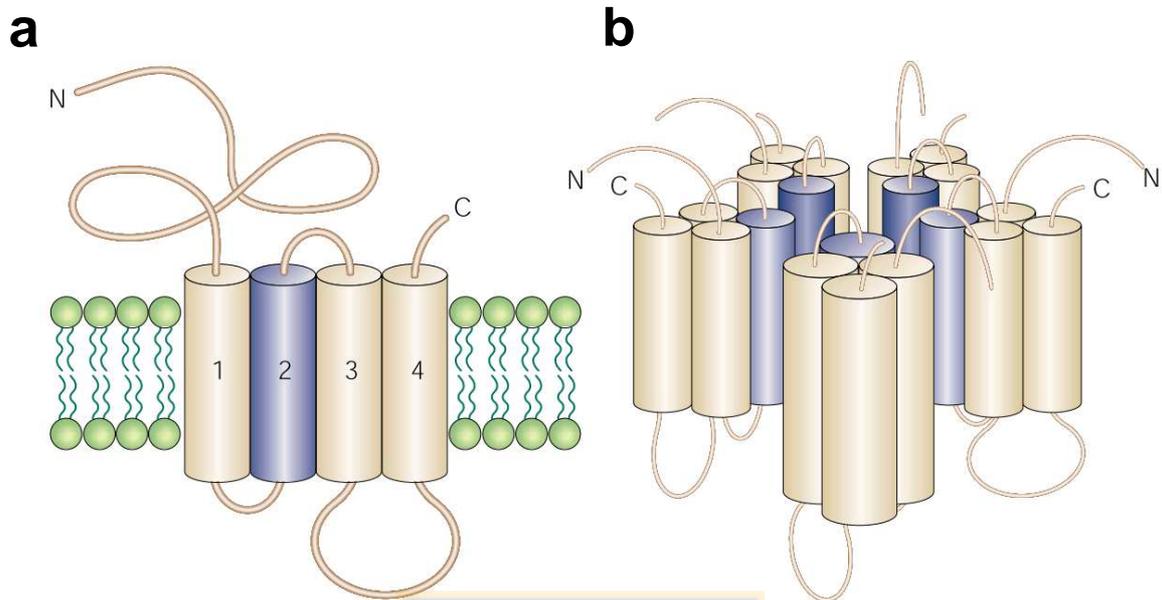
El GlyR pertenece a la superfamilia (LGIC), el cual incluye la familia Cys-loop compuesto por los receptores de GABA tipo A (R-GABA<sub>A</sub>), receptores nicotínicos de acetilcolina (R-nACh) y receptores de serotonina del tipo 3 (R-5-HT<sub>3</sub>). Su estructura corresponde a un complejo pentamérico formado por combinaciones de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$ ) y la subunidad  $\beta$ . Este receptor se puede organizar como un homopentámero, es decir, presentar solo subunidades  $\alpha$ , o bien, se puede presentar como un heteropentámero presentando una combinación de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (estequiometría  $3\beta-2\alpha$ ) (Figura 1), esto dependiendo del estado de desarrollo que presenten las neuronas (Lynch 2004). Numerosas líneas de evidencia bioquímica, biofísica, farmacológica y genética sugieren que la mayoría de la neurotransmisión glicinérgica en adultos es mediada por GlyR heteroméricos  $\alpha_1\beta$  (Legendre 2001; Aguayo et al. 2004; Lynch 2009).

Estudios farmacológicos *in vitro* han determinado que además de sus agonistas fisiológicos glicina,  $\beta$ -alanina y taurina, la función inhibitoria del GlyR en neuronas en cultivo puede ser modulada por una diversidad de moléculas, los cuales pueden potenciar o inhibir la función del GlyR, presentando distintos mecanismos de acción y perfiles farmacológicos. Entre ellos, el alcaloide estricnina es un antagonista competitivo capaz de bloquear las corrientes generadas por todas las subunidades del GlyR; por otro lado también está el

inhibidor no competitivo picrotoxina, el cual bloquea preferentemente GlyR homoméricos. Además, el GlyR es modulado positivamente por etanol, iones zinc, algunos esteroides y anestésicos generales (Laube et al. 2002; Smart, Hosie, and Miller 2004; Lynch 2004).

Mediante analogía con otras estructuras conocidas de miembros de la familia LGIC y mediante cristalografía de rayos X se ha determinado que la topología de cada una de las subunidades del GlyR corresponde a un dominio extracelular en el extremo amino terminal, 4 hélices transmembrana (TM1, TM2, TM3 y TM4) y un dominio citoplasmático o loop intracelular (IL) presente entre las hélices TM3 y TM4 cercano al extremo carboxilo terminal (Lynch 2004; Du et al. 2015; Huang et al. 2015).

Diversos estudios moleculares, bioquímicos, farmacológicos y cristalográficos han determinado que la hélice TM2 es la responsable de la formación del poro y la que determina las propiedades del canal iónico, mientras que el dominio extracelular es el responsable de la unión de agonistas, antagonistas y algunos moduladores (Bormann et al. 1994; Rajendra et al. 1995; Lynch 2004; Smart, Hosie, and Miller 2004). Por otro lado, el loop intracelular se ha asociado a una regulación por interacción proteína-proteína y por la acción de distintas quinasas (Cascio 2004; Lynch 2004). En tanto, la subunidad  $\beta$  pudiera estar relacionada con un rol más estructural y regulador, debido a que esta subunidad está asociada al citoesqueleto mediante la proteína gerifina (93 kDa), permitiendo el reclutamiento de los GlyR en la membrana postsináptica (Legendre 2001; Laube et al. 2002).



**Figura 1. Esquema representativo de la estructura de canales iónicos activados por ligando (LGIC) del tipo Cys-loop.**

**(a)** Estructuralmente, los LGIC poseen un extremo N-terminal extracelular, cuatro hélices transmembrana (TM1-4), un loop intracelular entre las hélices TM3-TM4 y un corto segmento C-terminal extracelular. **(b)** Estos receptores se organizan formando un pentámero en donde la hélice TM2 es importante para la formación del poro del canal (Moss and Smart 2001).

Diversos estudios han demostrado que la actividad de distintos canales iónicos es modulada por las subunidades  $G\beta\gamma$  de la proteína G, tales como los GlyRs (Yevenes et al. 2003), los canales de calcio activado por voltaje de alto umbral de tipo N (VGCC) (Ikeda 1996) y canales de potasio de tipo GIRK (Logothetis et al. 1987). Usando técnicas electrofisiológicas, bioquímicas y moleculares se ha demostrado que  $G\beta\gamma$  modula positivamente al GlyR a través de una disminución en el  $EC_{50}$  y un aumento en la probabilidad de apertura del canal (Yevenes et al. 2003). Los motivos de aminoácidos básicos 316-320 y 385,386 presentes en el loop intracelular del GlyR son esenciales para esta modulación (Figura 2). Esta modulación se realiza a través de una interacción directa entre  $G\beta\gamma$  y estos residuos aminoácidos, como se ha demostrado mediante ensayos de GST-pull down (Yevenes et al. 2006).

## **1.2 Modulación del GlyR por etanol**

La importancia que tiene etanol se debe a que la potenciación que produce en el GlyR tiene repercusiones tales como alteración del control motor, depresión respiratoria y depresión cardiovascular (Schmid, Bohmer, and Gebauer 1991; Krowicki and Kapusta 2011). Debido a que el GlyR se expresa en áreas específicas del cerebro, existe evidencia que apoya fuertemente la noción de que la acción de etanol sobre el GlyR causa al menos un subconjunto de sus efectos en el SNC. En este sentido, glicina estaría jugando un rol crítico en la modulación de la excitabilidad de neuronas asociadas con la transmisión del dolor, el ritmo respiratorio y coordinación motora (Legendre 2001; Lynch 2004; Harvey et al.

2004). Estudios en neuronas espinales y motoneuronas del núcleo hipogloso han mostrado que receptores que expresan la subunidad  $\alpha_1$  son sensibles a concentraciones farmacológicas relevantes (10-100 mM) de etanol (Aguayo and Pancetti 1994; Sebe, Eggers, and Berger 2003; Eggers and Berger 2004), sugiriendo que la disminución del control motor y la depresión respiratoria inducido por etanol serían producto de la inhibición de estas neuronas. Distintos estudios de comportamiento han demostrado que los GlyRs están implicados en algunos de los efectos agudos de etanol (Williams et al. 1995; Findlay et al. 2002; Blednov et al. 2015). De acuerdo a esto, la administración intracerebroventricular de glicina o su precursor serina, aumentó la duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR: loss of the righting reflex) inducido por etanol en ratones (Williams et al. 1995), y estos efectos fueron bloqueados por estricnina (Ye, Sokol, and Bhavsar 2009). De forma adicional, ratones knock-in (KI) con mutaciones en la subunidad  $\alpha_1$  (Q266I, M287L o D80A) demostraron cambios en la incoordinación motora inducida por etanol y en el LORR (Blednov et al. 2012; McCracken et al. 2013). Interesantemente, se ha demostrado además en nuestro laboratorio que ratones KI con mutaciones en la subunidad  $\alpha_1$  (KK385/386AA) del GlyR redujo la duración del LORR inducido por etanol (Aguayo et al. 2014).

Distintos estudios han determinado que la presencia de GlyRs en áreas superiores del cerebro como el núcleo accumbens (nAc) y área tegmental ventral (VTA), áreas importantes para el fenómeno de recompensa, estarían relacionado con la regulación de los niveles de dopamina (Ye 2000; Zheng and Johnson 2001). Se ha sugerido que el desarrollo de la adicción al alcohol está relacionado con la

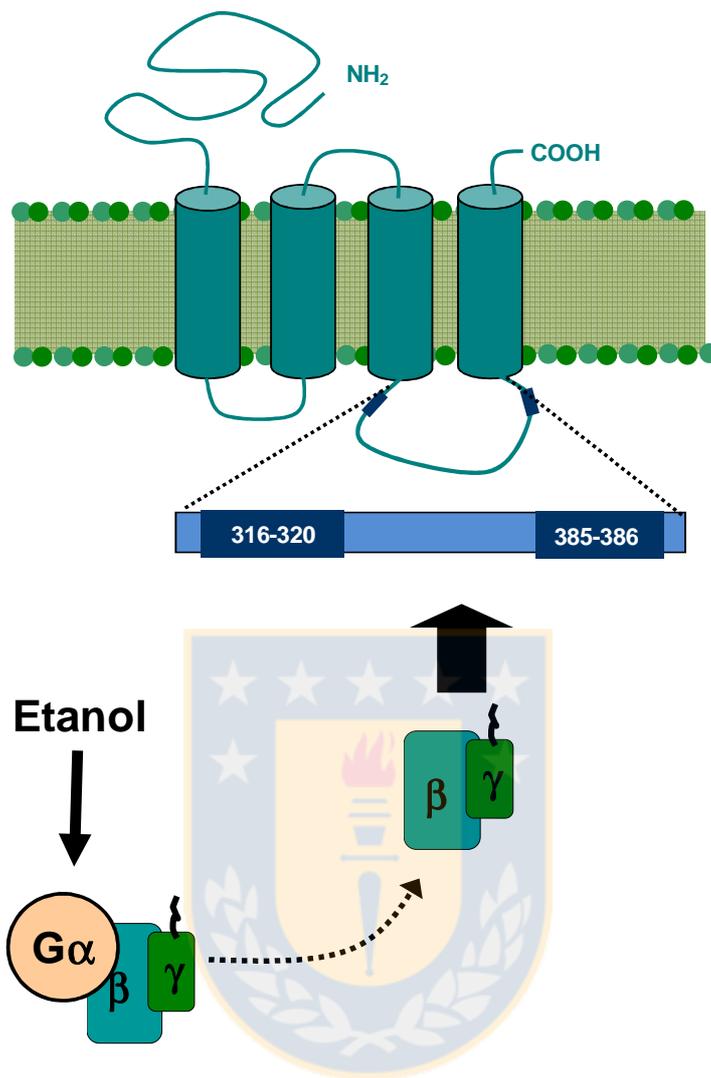
habilidad del etanol de incrementar los niveles de dopamina (DA) extracelular en el nAc del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Este sistema dopaminérgico, el cual se origina en el VTA y se proyecta principalmente al sistema límbico (el nAc, la amígdala, el septum y la corteza frontal) (Dahlstrom and Fuxe 1964), es una estructura clave en el sistema de recompensa del cerebro y se cree que es importante para la auto-administración de drogas (Wise 1987; Wise and Rompre 1989; Koob et al. 1994). Una serie de estudios usando microdiálisis *in vivo* en ratas han investigado el rol de los GlyR en el nAc en la modulación del sistema dopaminérgico mesolímbico (Molander and Soderpalm 2005a, 2005b). En este sentido, la perfusión de glicina en el nAc incrementa los niveles de dopamina y disminuye la preferencia y el consumo de alcohol. Estricnina, un antagonista del GlyR, aplicado mediante perfusión en el nAc disminuye los niveles de dopamina e incrementa el consumo de alcohol. Estudios adicionales han determinado que los niveles de glicina extracelular estarían implicados en modular el consumo y la preferencia al alcohol (Molander et al. 2007).

Todos estos antecedentes apoyan la idea de que GlyR juega un importante rol en las acciones que etanol ejerce sobre el sistema nervioso central, y que esto puede ser un nuevo mecanismo para el desarrollo de fármacos dirigidos a contrarrestar los problemas biomédicos relacionados con el consumo de etanol.

Diversos reportes han documentado que etanol potencia la actividad del GlyR, reflejándose en un aumento de las corrientes evocadas por glicina en presencia de este alcohol (Aguayo, Tapia, and Pancetti 1996; Mihic et al. 1997; Mascia et al. 1998; Yevenes et al. 2008). Para explicar el efecto potenciador que

etanol ejerce sobre los GlyRs, se han manejado dos teorías en cuanto a su mecanismo de acción. La primera de ellas es que a altas concentraciones de etanol (>200 mM), éste se uniría a dos sitios específicos entre las regiones TM2 y TM3, siendo importante la presencia de dos aminoácidos, S267 y A288, como lo han demostrado experimentos de mutagénesis (Mihic et al. 1997). La otra teoría es que su mecanismo de acción sería a través de señalización intracelular a concentraciones farmacológicas de etanol (<100 mM). Recientemente se ha demostrado que la subunidad  $\alpha_1$  del GlyR ( $\alpha_1$ GlyR) es sensible a estas concentraciones de etanol. Este efecto es mediado por un mecanismo que involucra al dímero  $G\beta\gamma$  de la proteína G, en donde la presencia de los motivos aminoacídicos básicos 316-320 y 385-386, ricos en lisina y arginina presentes en el loop intracelular del GlyR, son esenciales para que ambas proteínas interactúen y de esta forma etanol pueda ejercer su efecto potenciador sobre este receptor (Yevenes et al. 2008). La utilización de moléculas secuestradoras del dímero  $G\beta\gamma$  apoya esta propuesta. La sobreexpresión de un secuestrador de alta afinidad, ct-GRK2 (extremo c-terminal de la quinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico 1), el cual se une a  $G\beta\gamma$  con alta afinidad, estaría impidiendo que éste interactúe con  $\alpha_1$ GlyR, evitando que este receptor sea potenciado por etanol (Yevenes et al. 2008).

En el mismo sentido, se utilizó un anticuerpo contra  $G\beta$  aplicado intracelularmente en la pipeta de registro, en donde hubo una disminución en la potenciación del GlyR por etanol, confirmando de esta forma que la señalización mediada por  $G\beta\gamma$  es necesaria para la modulación del GlyR por este alcohol.



**Figura 2. Modelo para la modulación por etanol del GlyR.**

Concentraciones farmacológicas de etanol aumentan la disponibilidad de  $G\beta\gamma$  libre, el cual interacciona con la subunidad  $\alpha_1$  del GlyR a través de los aminoácidos básicos 316-320 y 385-386 presentes en el loop intracelular, potenciando reversiblemente las corrientes de  $Cl^-$  activadas por glicina (Yevenes et al. 2003; Yevenes et al. 2006; Yevenes et al. 2008).

Este mismo tipo de hallazgo ha sido demostrado también a nivel de actividad sináptica glicinérgica. Se ha demostrado con anterioridad en motoneuronas de hipogloso de ratas Sprague-Dawley que etanol es capaz de modificar los parámetros sinápticos, produciendo un aumento en la constante de tiempo de decaimiento, el cual es un reflejo de la alteración de la cinética del canal (Eggers, O'Brien, and Berger 2000; Eggers and Berger 2004). La generación reciente de un ratón C57BL/J6 *knock in* (KI) para el GlyR, en el cual se ha reemplazado lisinas por alaninas en las posiciones 385-386 presentes en el loop intracelular ha permitido reforzar los hallazgos con respecto a la importancia de este receptor en los efectos de alcohol. Se ha confirmado la importancia de estos residuos básicos en la modulación del GlyR por etanol, debido a que neuronas espinales en cultivo de estos ratones no presentan cambios en los parámetros sinápticos, ni se potencian las corrientes evocadas por glicina en presencia de concentraciones farmacológicas de etanol (Aguayo et al. 2014). Esto nos permite confirmar la importancia de la modulación por etanol en corrientes sinápticas glicinérgicas, especialmente relevante en aquellas zonas donde este tipo de actividad es de gran importancia para la modulación de la excitabilidad neuronal, como la médula espinal y el tronco encefálico.

Todos estos antecedentes nos permiten postular que el loop intracelular del GlyR (GlyR-IL) tiene un rol importante en la modulación por proteína G y en los efectos por etanol, en donde la interferencia de la interacción entre  $\alpha_1$ GlyR y G $\beta\gamma$  se convierte en una aproximación para inhibir los efectos de etanol mediados por estas proteínas.

### 1.3 Péptidos pequeños como herramienta farmacológica

El uso de péptidos ha sido una importante herramienta para el desarrollo de nuevo conocimiento en relación a las interacciones existentes entre proteínas, activación o inhibición de proteínas y al desarrollo de herramientas farmacológicas. Distintos reportes han utilizado péptidos pequeños para estudiar las vías de señalización GPCR con el objeto de dilucidar su organización estructural-funcional, formación de complejos y comprender su rol en el control de la señalización implicada. Ejemplos de estos son péptidos derivados de los dominios citoplasmáticos de receptores dopaminérgicos ( $D_1$ -DR,  $D_2$ -DR), receptores de serotonina ( $5-HT_6$ R,  $5-HT_{1B}$ R) o receptores muscarínicos de acetilcolina ( $m_4$ -AChR,  $m_3$ -AChR), los cuales se unen selectivamente y activan sus proteínas G respectivas, emulando la actividad del receptor activado (Konig and Gratzel 1994; Kubota and Wakamatsu 2008). A partir del receptor adrenérgico  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  se han diseñado péptidos para estimular a las proteínas  $G_{i/o}$  y  $G_s$ , respectivamente. Se han usado, además, estos péptidos para dilucidar las características estructurales para la activación de proteínas G acopladas a estos receptores, en donde se ha postulado que pueden ser potenciales herramientas farmacológicas (Munch et al. 1991; Wade et al. 1994). Otros ejemplos de este tipo de péptidos han sido usados para explorar las regiones intracelulares que los GPCR usan para activar proteínas G (Shpakov 2011). Además, otros tipos de vías de señalización han sido estudiados con el uso de péptidos. Por ejemplo, un péptido derivado del sitio de fosforilación del receptor de insulina (IR) potencia varias veces la estimulación

inducida por insulina de la señalización intracelular asociada a PI3K y MAPK (Kole et al. 1996; Bernier et al. 2000).

Notablemente, varios péptidos han sido estudiados en ensayos de fase I para el tratamiento de diversos cánceres, enfermedades metabólicas, inflamación, infección viral, etc (Tsuruma et al. 2004; Yoshimura et al. 2013; Aruga et al. 2014). Se ha reportado que la inhibición de las interacciones proteína-proteína por péptidos pequeños puede tener un potencial rol en la terapia anticancerígena. Por ejemplo, un estudio ha descrito recientemente el desarrollo de una pequeña molécula que imita una  $\alpha$ -helice (BH3-BH6) que interfiere con las interacciones entre Bcl-2, Bcl-xl y Mcl-1 con Bax, Bak, Bim o Bad y el cual promueve la apoptosis de células cancerígenas (Kazi et al. 2011). Moduladores de estas interacciones proteína-proteína han sido utilizados además para analizar el rol de componentes individuales para cada cascada de señalización. Tales moduladores peptídicos proporcionan importantes herramientas para la investigación básica y tienen un gran potencial como líderes para el desarrollo de nuevas clases de drogas terapéuticas (Souroujon and Mochly-Rosen 1998). En combinación con estudios *in silico*, el uso de péptidos pequeños se ha convertido en una estimulante aproximación en el descubrimiento de drogas y continúa siendo una promesa para avances posteriores significativos.

A partir de estos antecedentes se puede concluir que el uso de péptidos pequeños nos da una aproximación para el desarrollo de futuros compuestos líderes y además nos ayudan a comprender de mejor forma las interacciones

proteína-proteína implicadas en una vía de señalización y los determinantes moleculares implicados en ella.

#### **1.4 Inhibición de la señalización de $G\beta\gamma$ mediante péptidos y moléculas pequeñas**

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son una importante familia de targets terapéuticos. La transducción de las señales recibidas por los GPCRs es mediada por las proteínas G heterotriméricas, los cuales se disocian en  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . La señalización por el dímero  $G\beta\gamma$  de la proteína G es reconocida por ser altamente importante en diversos aspectos fisiopatológicos: falla cardiaca (Kamal, Smrcka, and Blaxall 2011), migración celular e invasión (Kirui et al.), tolerancia y dependencia farmacológica (Mathews, Smrcka, and Bidlack 2008), proceso inflamatorio (Lehmann, Seneviratne, and Smrcka 2008) y diversos aspectos endocrinos (Mahon et al. 2006), entre otros. Estructuralmente la subunidad  $G\beta$  está compuesta por siete repeticiones WD-40 formando una estructura  $\beta$ -propeller capaz de interactuar con un amplio rango de proteínas, pero siempre manteniendo un alto grado de especificidad. Se cree que el reconocimiento multi-target de  $G\beta\gamma$  es a través de una superficie proteica común o "hot spot" que acomoda múltiples sitios de unión. Esto quiere decir que a pesar de que muchos efectores comparten este mismo sitio de unión en  $G\beta$ , la combinación de aminoácidos necesarios para esta interacción es única (Lin and Smrcka 2011). Este sistema sería de gran interés farmacológico si ciertos complejos proteicos  $G\beta\gamma$ -efector pudieran ser específicamente bloqueados con el objeto de interferir

con alguna de las enfermedades en el cual  $G\beta\gamma$  está implicado. Uno de los primeros intentos de bloquear la función de  $G\beta\gamma$  con péptidos fue desarrollado en el contexto del análisis de la modulación que este dímero tiene sobre algunos tipos de adenilil ciclasa (AC). Chen y colaboradores inhibieron la actividad estimulada por  $G\beta\gamma$  de la adenilil ciclasa de tipo 2 incluyendo en el ensayo un péptido proveniente del dominio C2 de esta enzima (QEHA). Al mismo tiempo, este péptido inhibió la actividad de otros efectores como fosfolipasa C (PLC), quinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ -ARK) y canales de potasio rectificadores internos activados por proteína G (GIRK) (Chen et al. 1995). Resultados similares se obtuvieron estudiando el efecto de péptidos provenientes de GIRK, en la regulación por  $G\beta\gamma$  de este canal (Krapivinsky et al. 1998).

En una serie de estudios, Smrcka y colaboradores utilizaron la técnica de arreglo de fagos usando bibliotecas de péptidos para el screening de péptidos que se unen a  $G\beta$  (Scott et al. 2001). Con esto se obtuvo información acerca de la presencia de un hot spot sobre la superficie de la proteína, y también se determinó que estos péptidos podrían afectar diferencialmente las interacciones con varios efectores. El péptido más interesante encontrado, SIRKALNILGYPDYD (SIRK), bloqueó la activación dependiente de PLC y PI3K *in vitro*, pero no la inhibición de los canales de calcio activados por voltaje. Un análogo de este péptido (SIGK) fue exitosamente cristalizado (Davis et al. 2005) y esta estructura fue utilizada en estudios de Docking y Screening Virtual para identificar moléculas pequeñas no peptídicas que se unen al mismo sitio que SIGK lo hace en  $G\beta$  (Bonacci et al. 2006). En este caso la biblioteca inicial para el Screening Virtual fue la biblioteca

de diversidad del Instituto Nacional del Cancer (NCI: National Cancer Institute) el cual contiene sólo 1990 compuestos diversos seleccionados desde una biblioteca más grande del NCI de 250.251 compuestos. El programa FlexX fue usado para el docking de estos compuestos al hot spot previamente identificado, en donde el puntaje de docking obtenido se basa en los términos de C-Score: D-score, G-score, F-score, Chemscore, and PMF-score (Clark et al. 2002). El 1% de los compuestos con mejor puntaje de cada lista fueron seleccionados, resultando en 85 compuestos no redundantes. La actividad de estos compuestos fue examinada *in vitro*, midiendo la capacidad de competir con el péptido SIGK unido a un fago en la unión a  $G\beta_1\gamma_2$  biotinilado mediante ensayos de ELISA (Scott et al. 2001). Nueve de los 85 compuestos inhibieron la unión de SIRK con un  $IC_{50}$  en un rango entre 0,1 y 60  $\mu$ M. Veintiún análogos de M119, uno de los compuestos más potentes, fueron seleccionados desde la biblioteca del NCI, proporcionando un estudio de relación estructura-actividad (SAR) inicial e identificándose aquellos grupos químicos en M119 más importantes para la interacción. M119 y M201 fueron extensamente examinados en ensayos *in vitro* e *in vivo* para caracterizar las consecuencias biológicas de la unión de  $G\beta\gamma$ . Mientras M119 atenuó la activación dependiente de  $G\beta\gamma$  de PLC $\beta$ 2, PLC $\beta$ 3 y PI3K $\gamma$ , la molécula M201 no afectó la activación de PLC $\beta$ 2 por  $G\beta\gamma$ , sin embargo potenció la activación dependiente de  $G\beta\gamma$  por PLC $\beta$ 3 y PI3K $\gamma$ . De forma interesante, éste y otros estudios han demostrado que estas moléculas que se unen a  $G\beta\gamma$  (M119/galleína) son efectivos en modelos animales de inflamación, analgesia y falla cardíaca

(Mathews, Smrcka, and Bidlack 2008; Lehmann, Seneviratne, and Smrcka 2008; Casey et al. 2010).

Mientras no se tenga una explicación satisfactoria para este comportamiento, se sugiere que es posible desarrollar drogas que interfieran con la interacción proteína-proteína capaces de interferir selectivamente con los complejos y vías específicas mientras se conservan intactas las interacciones con otras proteínas mediados por la misma superficie proteica (Lin and Smrcka 2011). Estos trabajos también destacan la importancia de una buena caracterización del target, el cual ayudó a centrar la búsqueda del screening virtual alrededor de la ubicación del hot spot.

### **1.5 Inhibición del efecto de etanol sobre el GlyR usando péptidos pequeños que se unen a G $\beta\gamma$**

El heterodímero G $\beta\gamma$  de la proteína G tiene una gran variedad de efectores: fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), fosfolipasa C $\beta$  (PLC- $\beta$ ), adenilato ciclasa (AC), diversos canales iónicos, entre otros, los cuales ejercen una variedad de efectos fisiológicos en la célula. Todos estos efectos son producidos mediante interacciones directas con G $\beta\gamma$  (Ford et al. 1998). En la estructura del heterodímero G $\beta\gamma$  existe una región común de unión de distintos efectores, denominado "hot spot". Este sitio puede ser bloqueado por péptidos pequeños o moléculas interfiriendo con las interacciones proteína-proteína e impidiendo la activación de determinados efectores por parte de G $\beta\gamma$  (Scott et al. 2001). De esta

forma, algunos estudios han evaluado distintos péptidos capaces de interferir con la actividad de  $G\beta\gamma$  sobre determinados efectores (Chen et al. 1995; Krapivinsky et al. 1998). Usando una estrategia similar, en nuestro laboratorio se han diseñado péptidos capaces de bloquear la potenciación generada por etanol del GlyR mediada por  $G\beta\gamma$ . Se ha estudiado el efecto que ejerce un péptido de 17 aminoácidos derivado del extremo amino terminal del loop intracelular del  $\alpha_1$ GlyR denominado RQH (RQHKELLRFRRKRRHHK), sobre la potenciación del GlyR inducida por etanol (Guzman et al. 2009). En este estudio se demostró mediante ensayos de interacción por GST pull down que el péptido RQH interfiere con la interacción  $\alpha_1$ GlyR- $G\beta\gamma$  en una forma dependiente de la concentración de péptido. Además, el péptido RQH fue capaz de interferir con la unión de  $G\beta\gamma$  a otros dos efectores fusionados a GST, tales como ct- $\beta$ ARK (extremo carboxilo terminal de la quinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico) y GIRK1 (aminoácidos 184-501 del canal de potasio de rectificación interna activados por proteína G). Esto se explica ya que al comparar *in silico* la posición de unión predicha de RQH en la estructura cristalizada de  $G\beta\gamma$  mediante modelamiento molecular, se encontró que las regiones para la unión de RQH,  $\beta$ ARK, y GIRK1 están parcialmente sobrepuestas (Guzman et al. 2009). Todo lo anterior se manifiesta funcionalmente, ya que cuando el péptido fue aplicado intracelularmente a células HEK293 que expresaban  $\alpha_1$ GlyR, se atenuó la potenciación del receptor por 100 mM de etanol. Además, en células HEK293 que co-expresaron receptores metabotrópicos  $GABA_B$  y canales de tipo GIRK, la presencia de RQH provocó una inhibición de la activación mediada por  $G\beta\gamma$  de GIRK cuando  $GABA_B$  fue estimulado con baclofen

(Guzman et al. 2009). Estos antecedentes permitieron concluir que el péptido RQH es capaz de inhibir mediante ensayos *in vitro* (GST pull down) la unión de  $G\beta\gamma$  al GlyR, y a través de técnicas electrofisiológicas de patch clamp se determinó que el péptido RQH disminuyó el porcentaje de potenciación del GlyR por etanol. Sin embargo, su efecto inhibitorio no fue específico hacia el GlyR.

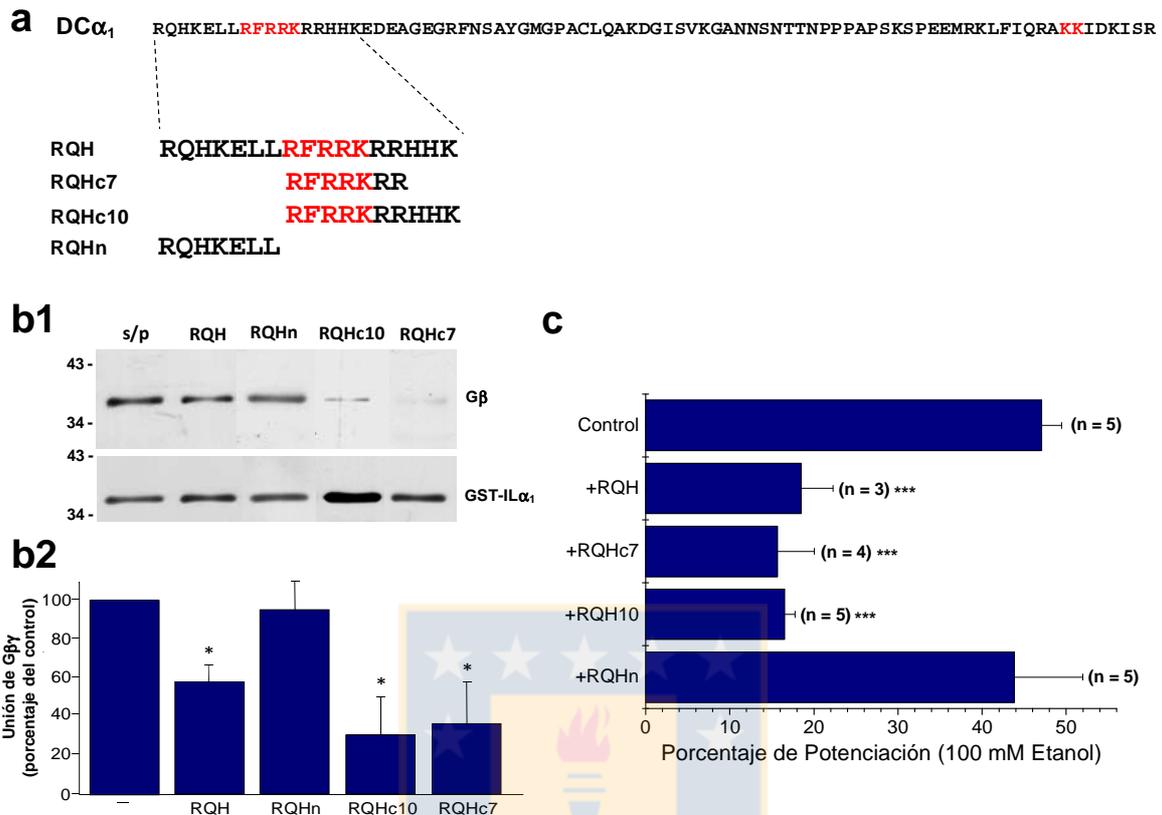
Para intentar disminuir esta falta de especificidad acotando la disponibilidad de interacción entre el péptido y  $G\beta$ , se procedió a disminuir el número de aminoácidos en el péptido RQH, generando una variedad de péptidos (Figura 3a). Estos péptidos fueron estudiados en cuanto a su capacidad de interferir con las interacciones  $G\beta\gamma$ -GlyR $\alpha_1$  (Figura 3b) mediante ensayos de interacción por GST-pull down, y mediante ensayos funcionales de patch clamp su capacidad de inhibir la potenciación de las corrientes evocadas por glicina del GlyR por 100 mM de etanol (Figura 3c), encontrándose que los péptidos RQHc7 y RQHc10 son potentes inhibidores (San Martin et al. 2012). Estos datos indican la importancia de los aminoácidos básicos en estos péptidos, debido a que el péptido RQHn carece de la actividad inhibitoria que poseen los péptidos RQHc7 y RQHc10. Esto se corroboró mediante estudios *in silico* de Docking y Dinámica Molecular en donde se determinó que el péptido RQHc7 interactúa con los residuos de ácido aspártico 186, 228 y 246 en  $G\beta$  (Figura 4), los cuales parecen ser críticos para esta interacción, posiblemente contribuyendo electrostáticamente con cargas negativas para interactuar con los residuos básicos de arginina 3, 6 y 7 en el heptapéptido. A pesar de que este dato nos entrega información acerca de los aminoácidos importantes en  $G\beta$  para la interacción con el péptido RQHc7, **hasta ahora no se**

**conoce el efecto funcional de estos residuos en la modulación del GlyR por el dímero G $\beta$  $\gamma$ .**

Las moléculas peptídicas no son los candidatos farmacológicos más favorables para ser ensayado en modelos animales, debido a que su tamaño y estructura dificultaría su paso hacia el SNC (Marqusee, Robbins, and Baldwin 1989; Finkelstein, Badretdinov, and Ptitsyn 1991), sin embargo, estos péptidos son las primeras aproximaciones moleculares que interfieren directamente con los efectos de etanol. La obtención de moléculas pequeñas y específicas para el efector que se desea bloquear, son problemáticas que ha sido abordado en trabajos previos en relación al desarrollo de compuestos que sean capaces de interferir con la actividad de proteínas G (Davis et al. 2005; Bonacci et al. 2006). El diseño de minipéptidos que antagonicen el efecto de etanol sobre LGIC es de gran importancia, ya que abre nuevas posibilidades para el estudio de moléculas que puedan ser usadas como fármacos, y en el caso particular del GlyR para interferir con alguna de las manifestaciones tóxicas que produce el consumo de etanol. Sin embargo hasta ahora no se conoce el efecto que tiene el péptido RQHc7 en corrientes sinápticas glicinérgicas en neuronas en cultivo, así como también se desconoce el efecto del péptido en la activación de otros efectores de G $\beta$  $\gamma$ . Por otro lado, toma importancia conocer además la ubicación de este péptido al interior de la célula. Es por ello que teniendo como base los antecedentes del péptido RQHc7 como inhibidor del efecto de etanol en el GlyR, es que en la sección 3.1 **se examinó el efecto del péptido RQHc7 en transmisión sináptica, se analizó su especificidad y su localización celular.** En esta sección del

trabajo se ampliará el conocimiento acerca del péptido RQHc7, así como también se determinará la importancia funcional de los residuos en G $\beta$  que han sido identificados *in silico* como importantes para su interacción con el péptido RQHc7.





**Figura 3. Bloqueo de la potenciación del GlyR por etanol por péptidos pequeños.**

**(a)** Péptidos derivados del extremo N-terminal del loop intracelular presente entre TM3-TM4 en el GlyR: RQH, RQHc7, RQHc10 y RQHn. **(b)** Análisis por Western Blot de ensayos GST-pull down en donde se analizó la interacción entre G $\beta$ y y  $\alpha$ 1GlyR-IL. **(b1)** La señal de G $\beta$  se considera una medida de la asociación de G $\beta$ y al GlyR. Los correspondientes péptidos (2  $\mu$ M) fueron incluidos en el ensayo para determinar su capacidad de interferir con esta interacción. **(b2)** Cuantificación de la interacción de G $\beta$  al GlyR. **(c)** 200  $\mu$ M de los péptidos pequeños fueron aplicados intracelularmente en la pipeta de registro y luego de 15 minutos se registraron en células HEK293 las corrientes evocadas por una concentración de glicina correspondiente al EC<sub>15</sub> (15  $\mu$ M) en presencia de etanol (100 mM), cuantificándose el porcentaje de potenciación de la corriente (San Martín et al. 2012).

## 1.6 Búsqueda mediante screening virtual de moléculas pequeñas que se unen a Gβγ

Los péptidos han mostrado ser herramientas valiosas y efectivas cuando tienen como blanco un limitado número de receptores extracelulares. El concepto de usar péptidos para modular procesos intracelulares ha sido investigado por décadas, debido a que los péptidos juegan un rol central en cada célula (Souroujon and Mochly-Rosen 1998; Kazi et al. 2011). Sin embargo, aunque los péptidos son candidatos atractivos para estabilizar o interrumpir las interacciones proteína-proteína, su eficacia *in vivo* se encuentra comprometida debido a que los péptidos tienen habilidad limitada para entrar a las células, son inherentemente inestables dentro del cuerpo y son filtradas desde el torrente sanguíneo por el riñón en pocos minutos (Varga, Wickham, and Lauffenburger 2000). Además, cuando los dominios helicoidales son producidos en el laboratorio como entidades discretas desconectadas de la proteína completa, los péptidos pierden su estructura secundaria (Marqusee, Robbins, and Baldwin 1989; Finkelstein, Badretdinov, and Ptitsyn 1991). Esto disminuye su actividad biológica y los hace susceptible a la degradación por proteasas, previniendo además la recaptación celular necesaria para ejercer su actividad biológica.

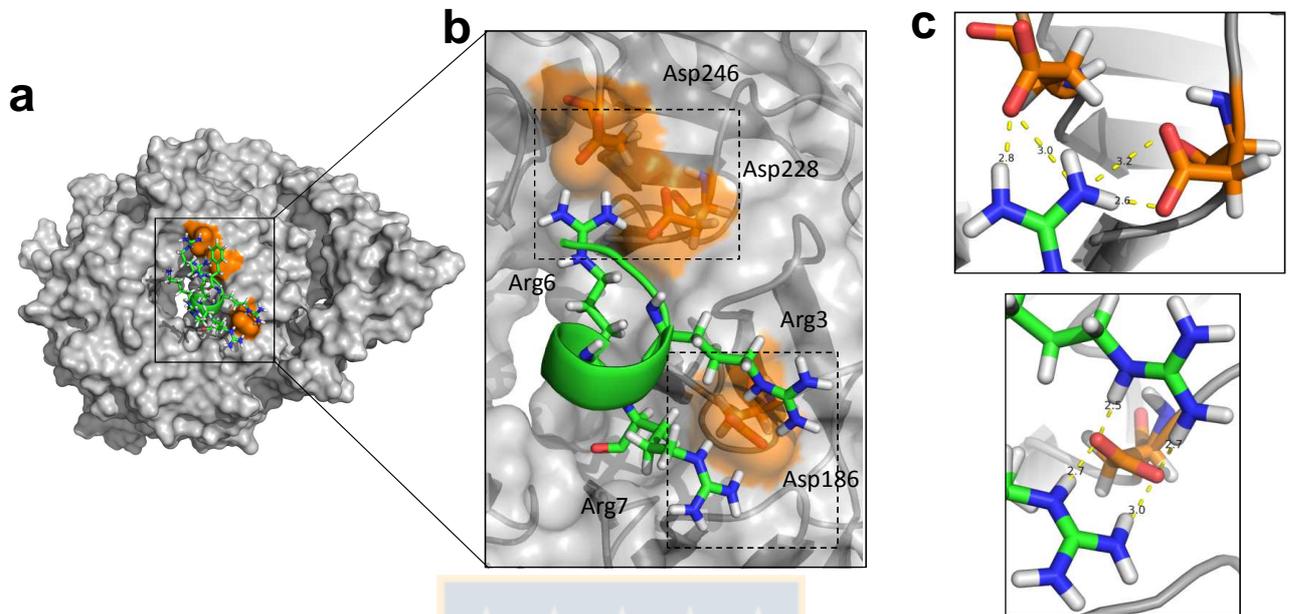
Debido a las problemáticas existentes al usar moléculas peptídicas con potencial uso farmacológico, existe otra aproximación que es la búsqueda de moléculas pequeñas orgánicas que emulen las características de unión del péptido en cuestión. La obtención de estas nuevas moléculas con potencial farmacológico implica el screening físico de bibliotecas de compuestos químicos

contra el blanco de interés. Una aproximación alternativa, conocida como Screening Virtual, es la realización de screening computacional de acuerdo a criterios estructurales (*in silico*) utilizando extensas bases de datos de moléculas y ensayar aquellas que poseen una mejor predicción de interacción con el receptor (Shoichet et al. 2002; Shoichet 2004). En nuestro laboratorio se ha estado trabajando con esta aproximación experimental para el caso del péptido RQHc7. Inicialmente se determinó mediante estudios de Docking y Dinámica Molecular que el péptido RQHc7 interactúa con los residuos de ácido aspártico (Asp) 186, 228 y 246 en G $\beta$  (Figura 4). Estos residuos en G $\beta$ , parecen ser críticos para esta interacción con RQHc7, posiblemente contribuyendo electrostáticamente con cargas negativas para interactuar con los residuos de arginina 3, 6 y 7 en el heptapéptido (San Martin et al. 2012). Este estudio permitió la identificación del sitio de interacción entre G $\beta$  y el péptido RQHc7. Posteriormente, usando el programa Glide 5.5 (Schrödinger) y utilizando la base de datos ZINC (5.548.741 moléculas) se realizó un Screening Virtual para identificar moléculas con potencial farmacológico capaces de unirse a G $\beta$  en el sitio de interacción identificado para el péptido RQHc7. Brevemente, se consideró la estructura del sitio de unión de ligando en una caja virtual de 23x19x23 Å<sup>3</sup>, conteniendo los residuos Asp 186, 228 y 246. Utilizando una serie de criterios para el filtrado de estas moléculas, predicción de descriptores, docking sucesivos y predicción de energía libre de unión, se obtuvieron 61 moléculas pequeñas con una alta capacidad de unión al sitio en G $\beta$  donde se une el péptido RQHc7 (Fabián Cerda, Tesis Bioingeniería, 2012). Este subconjunto de moléculas tiene la particularidad de presentar

características de interés farmacológico gracias a todos los criterios aplicados durante el screening de estos compuestos. Esto quiere decir que las moléculas obtenidas presentan adecuados predictores de propiedades: masa molar, hidrofobicidad, logaritmos de solubilidad, logaritmos del coeficiente de partición cerebro/sangre, predictor de permeabilidad, entre otros criterios, lo que los cataloga como compuestos con potencial farmacológico.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos y debido a la importancia farmacológica de interferir con los efectos que etanol produce en el sistema nervioso central mediado por los GlyRs, es que en la sección 3.2 de este trabajo **se identificaron moléculas pequeñas no peptídicas que se unen a  $G\beta\gamma$  que inhiben la potenciación por etanol del GlyR con potencia y selectividad.** Estos estudios nos permitirán además **identificar un compuesto capaz de revertir los efectos del alcohol en modelos de comportamiento animal.**

Todos los antecedentes expuestos sugieren que el uso de péptidos y moléculas pequeñas son capaces de inhibir los efectos de etanol en el GlyR mediante la interferencia de la interacción entre GlyR- $G\beta\gamma$ , revirtiendo algunos de los efectos producidos por esta droga en el sistema nervioso central.



**Figura 4. Zona de interacción entre el dímero Gβγ y el péptido RQHc7.**

(a) Estructura tomada desde un docking y dinámica molecular de 20 ns muestra la posición que adopta el péptido RQHc7 para interactuar con el dímero Gβγ. (b) Zoom de los residuos que interactúan: Arg 3, 6 y 7 desde RQHc7 y Asp 186 y 228 de Gβγ. (c) Detalles (rectángulos discontinuos en b) de las distancias entre átomos del péptido RQHc7 y Gβγ con posibilidad de interactuar (calculadas en Armstrong)(San Martín et al. 2012).

## HIPÓTESIS

A partir de los estudios recientes de nuestro laboratorio se sugiere que la interferencia de las interacciones  $G\beta\gamma$ -GlyR parece ser una prometedora estrategia farmacológica para el desarrollo de compuestos que permitan inhibir algunos de los efectos que etanol produce debido a su consumo agudo o crónico y que son mediados por GlyRs. Nuestro laboratorio ha desarrollado péptidos derivados de la región amino terminal del loop intracelular del GlyR capaces de interferir con la potenciación inducida por etanol de este receptor en forma específica. Sin embargo, se hace necesario ampliar el conocimiento con respecto al péptido RQHc7 y recurrir a la búsqueda de moléculas con potencial farmacológico que puedan cumplir con esta misma función inhibitoria. En nuestro laboratorio se realizó un screening virtual basado en la interacción de  $G\beta\gamma$  con el péptido RQHc7, con el objetivo de identificar moléculas pequeñas capaces de inhibir los efectos potenciadores de etanol en el GlyR. En base a los antecedentes previamente expuestos, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: **“Moléculas pequeñas que interfieren con la interacción entre  $G\beta\gamma$  y el GlyR inhiben los efectos de etanol en el GlyR en modelos *in vitro* e *in vivo*”**

## OBJETIVOS

**Objetivo General:** En base a los antecedentes anteriormente expuestos, se plantea el siguiente objetivo general:

**“Identificar péptidos y moléculas pequeñas que inhiban los efectos de etanol sobre el GlyR en modelos *in vitro* e *in vivo*”.**

**Objetivo Específico 1: Caracterizar el efecto del péptido RQHc7 en transmisión sináptica, su especificidad y su localización celular.**

- **Actividades:**

**1a.** Caracterizar el efecto del péptido RQHc7 en neuronas espinales y otros efectores celulares.

**1b.** Determinar localización celular del péptido RQHc7.

**1c.** Determinar los residuos importantes en G $\beta$  $\gamma$  para su interacción con el GlyR.

**Objetivo Específico 2: Identificar moléculas pequeñas no peptídicas que inhiban la potenciación del GlyR por etanol.**

- **Actividades:**

**2a.** Caracterizar la potencia de las moléculas M554 y M890 en su capacidad de inhibir la potenciación del GlyR por etanol.

**2b.** Estudiar análogos de M554 y M890 con el objetivo de realizar un análisis de relación estructura-actividad (SAR) preliminar.

**2c.** Determinar *in vivo* el efecto de las moléculas con mayor potencia en comportamiento animal expuesto a concentraciones farmacológicas de etanol.

**2d.** Estudiar el efecto de M554 en los niveles de dopamina extracelular en el nAc.



## 2. MATERIALES Y MÉTODO

### 2.1 GENERALIDADES

**2.1.1 Cultivo celular:** Las células HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) fueron cultivadas al 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> a 37°C en D-MEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Invitrogen) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Hyclone). Para el caso de neuronas espinales, éstas fueron obtenidas desde 5-6 embriones de ratones preñados (C57BL/J6) de 13-14 días de gestación, las cuales fueron plaqueadas a 150.000 células/ml en placas de cultivos de 35 mm cubiertas con poli-L-lisina (PM 350 kDa). Medio feeding neuronal: 95% Medio mínimo esencial (MEM, GIBCO, Rockville, MD), 5% suero de caballo inactivado con calor (GIBCO), y una mezcla de suplementos nutritivos. El tratamiento de los animales en cuanto a su mantención y eutanasia siguió con todos los lineamientos bioéticos internacionales y que fueron descritos por CONICYT 2008.

**2.1.2 Transfección:** 1 a 2 µg de los vectores de expresión fueron transfectados con Xfect Transfection Reagent (Clontech) en células HEK293 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas fueron incubadas entre 16 a 24 horas y posteriormente, utilizadas para los ensayos de patch clamp.

**2.1.3 Animales:** Los animales usados en ensayos de comportamiento corresponden a ratones C57BL6/J de 9-14 semanas (20-30 g). En ensayos de pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR) también se utilizaron ratones

knockin con una mutación que reduce la modulación intracelular de la subunidad  $\alpha_1$  del GlyR (Aguayo et al. 2014). El cuidado de estos animales y los protocolos de experimentación en los ensayos de comportamiento fueron aprobados por el Comité de Uso de Animales de la Universidad de Concepción y conducidos de acuerdo a los protocolos éticos establecidos por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) y el Comité Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT). Para los estudios de microdiálisis *in vivo*, ratas Wistar machos adultas (250-300 g) fueron proporcionadas por Taconic, Ejby, Dinamarca. Para estos estudios, los protocolos fueron llevados a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC) y aprobados por el Comité de Ética para Experimentos en Animales, Gotemburgo, Suecia. Todos los animales usados en esta tesis fueron mantenidos en grupos de cuatro a temperatura y humedad constantes. Se permitió que todos los animales se adapten por 1 semana al nuevo ambiente antes de que cualquier experimento sea llevado a cabo. Se mantuvieron bajo condiciones regulares de luz-oscuridad con libre acceso a comida y agua.

**2.1.4 Docking Molecular:** para poder predecir el sitio de interacción de un ligando sobre un receptor, se utiliza una herramienta bioinformática denominada docking molecular. Se utilizan las coordenadas de sus componentes estructurales, en donde un programa computacional es capaz de asignar un puntaje a dicho modelo de interacción. El puntaje asignado por Docking se basa en los términos observados en la ecuación 1, y debido a que los valores son negativos, el menor

puntaje corresponderá al mejor valor. Los términos considerados son las fuerzas de Van der Waals (VdW), energía potencial electrostática (Coul), un término asociado a hidrofobicidad que recompensa interacciones hidrofóbicas favorables (Lipo), un término asociado a puentes de hidrógeno (Hbond), un término asociado a uniones con metales (Metal), un término que penaliza la presencia de grupos polares enterrados (BuryP), un término para penalizar enlaces rotables fijos (RotB), y un término que recompensa las interacciones polares (Site) (Friesner et 2004).

$$Gscore = 0,065 \times vdW + 0,130 \times Coul + Lipo + Hbond + Metal + BuryP + RotB + Site$$

(Ecuación 1)

En este estudio se utilizó el programa computacional Glide (Schödinger, 2009) en su modalidad Docking flexible para determinar la posición y el puntaje asignado en la unión de las moléculas M554 y M890 en el sitio de interacción de RQHc7 en G $\beta$  (San Martín, 2012). La estructura tridimensional de G $\beta$  fue obtenida desde el sitio web perteneciente a Protein Data Bank (código: 1TBG) (Sondek, 1996). Por otro lado, las estructuras atómicas de ambas moléculas fueron creadas y revisadas utilizando el programa computacional MarvinSketch (ChemAxon 2013).

## **2.2 ESTUDIOS IN VITRO**

**2.2.1 Electrofisiología:** Los registros de corrientes fueron obtenidas mediante la técnica de patch clamp (Hamill et al. 1981) en configuración “whole-cell” utilizando un amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments) y un microscopio invertido, acoplado a una unidad de fluorescencia. El potencial de membrana fue fijado a -60

mV. Los electrodos de registro fueron construidos a partir de capilares de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) en un “puller” horizontal (Sutter Instruments P-89, Novato, CA). La corriente fue filtrada a 2 kHz y guardada utilizando un computador conectado al sistema de registro mediante una tarjeta de adquisición (Digidata 1200, Axon Instruments, Inc.) y el programa computacional Clampex 9.2 (Axon Instruments, Inc.). Para el registro de corrientes glicinérgicas el medio de cultivo del plato se cambió por una solución externa que contenía (en mM) 150 NaCl, 5.4 KCl, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, pH 7.4 y 10 glucosa. La pipeta de registro contenía una solución interna que presentaba (en mM) 140 KCl, 10 BAPTA, 10 HEPES (pH 7.4), 4 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP y 0.5 GTP. Los distintos compuestos a estudiar se agregaron directamente a la solución interna de tal forma de alcanzar el interior de la célula. Las aplicaciones de ligando y/o modulador fueron realizadas mediante un set de pipetas móviles (200 µm de diámetro) colocadas cerca de la célula (50 µm) y conectadas a un reservorio de 20 ml.

**2.2.2 Corrientes mediadas por GlyR:** Para ensayar la capacidad de los distintos péptidos y moléculas pequeñas de disminuir la potenciación del GlyR, etanol (100 mM) fue co-aplicado junto con glicina (15 µM) a células HEK293 y los resultados fueron expresados como porcentaje de potenciación a los 15 minutos. Se utilizaron distintas concentraciones de moléculas pequeñas en donde se graficó el porcentaje de potenciación versus concentración, con el objetivo de evaluar la potencia de estos compuestos determinando valores de IC<sub>50</sub>.

**2.2.3 Modulación tónica mediada por GlyRs:** Para determinar el efecto de las subunidades  $G\beta$  mutantes en la modulación tónica del GlyR, se sobreexpresaron las subunidades  $G\beta_1\gamma_2$  en células HEK293 y se realizaron curvas concentración-respuesta a glicina (1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000  $\mu\text{M}$ ). Se determinaron los valores de  $EC_{50}$  para cada mutante sobreexpresada. Para confirmar que la proteína  $G\beta\gamma$  estaba siendo expresada en la célula, se utilizó un vector de expresión para la proteína  $G\beta_1$  en fusión a EYFP (pEYFP- $G\beta_1$ ), el cual mediante fluorescencia se determinó la expresión de este vector.

**2.2.4 Corrientes sinápticas espontáneas glicinérgicas:** Corrientes postsinápticas inhibitorias glicinérgicas espontáneas en miniatura (IPSC) fueron aisladas farmacológicamente mediante la aplicación de CNQX (4  $\mu\text{M}$ ) y bicuculina (4  $\mu\text{M}$ ) a la solución externa para bloquear los receptores AMPA y  $GABA_A$  respectivamente. También se agregó TTX (100 nM) para bloquear la transmisión sináptica generada por potenciales de acción. Para estudiar la sensibilidad de IPSCs glicinérgicas a etanol, neuronas espinales de 13-16 días en cultivo fueron perfundidas con 100 mM de etanol durante 2 minutos, mientras las IPSCs fueron adquiridas utilizando el programa Axoscope 6.0.

**2.2.5 Corrientes mediadas por canales GIRK:** Para experimentos con canales de potasio de rectificación interna activados por proteína G (GIRK), la solución externa contenía (en mM) 125 NaCl, 30,0 KCl, 3.0  $CaCl_2$ , 1.0  $MgCl_2$ , 10 HEPES,

pH 7.4 y 10 glucosa y las corrientes de  $K^+$  fueron activadas con 10  $\mu$ M de baclofen cada 2 minutos durante 8 minutos en células HEK293 co-transfectadas con plásmidos que codifican para  $GABA_{B1}$ ,  $GABA_{B2}$ ,  $GIRK_1$  y  $GIRK_4$ , de tal forma de ensamblar un canal iónico permeable a  $K^+$ . Para determinar las células positivamente transfectadas, el plásmido que contiene  $GABA_{B1}$  también contiene el gen que codifica para GFP, identificando las células positivamente transfectadas gracias a la unidad de fluorescencia acoplada al microscopio invertido que será utilizado durante los registros electrofisiológicos.

**2.2.6 Liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular mediado por  $PLC\beta$ :** células promielocíticas de leucemia humana (HL-60) fueron sembradas en frascos de 75  $mm^2$  a una densidad de  $0,1 \times 10^6$  células/ml en 35 ml de RPMI1640 el cual contiene 10% de FBS, penicilina y estreptomina. Para diferenciar a neutrófilo se añadió DMSO 1,2% al cultivo por 72 horas (Bonacci, 2006). Luego de la diferenciación, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en HBSS (solución salina equilibrada de Hank con 1X tampón de HEPES 20 mM) a 250.000 células/pocillo/100 ml. Posteriormente, las células fueron cargadas con Fluo8 NW durante 30 minutos a 37°C. Se añadió a las células las moléculas M554, M890 o M119 o el péptido RQHc7 por 15 minutos a temperatura ambiente y luego fueron estimuladas con N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular fueron medidos usando un lector de microplacas NOVOstar (BMG Labtech, Germany).

**2.2.7 Viabilidad celular:** Para los ensayos de viabilidad celular se utilizó Alamar Blue, el cual es un compuesto permeable, no tóxico, que mide el poder reductor de células vivas. Las células vivas reducen resazurina (componente azul no fluorescente del reactivo) a resorufina, componente rojo altamente fluorescente que se mide por espectrofotometría. Una vez realizadas incubaciones con las diferentes moléculas pequeñas se adicionó 1:10 del reactivo Alamar Blue (Invitrogen), incubando durante 1 hora a 37°C, protegido de la luz. La medición de fluorescencia se realizó usando un lector de fluorescencia (NOVOstar, BMG Labtech) utilizando una longitud de onda de excitación de 540 nm y de emisión de 595 nm. Los valores obtenidos de intensidad de fluorescencia se graficaron como porcentaje del control.

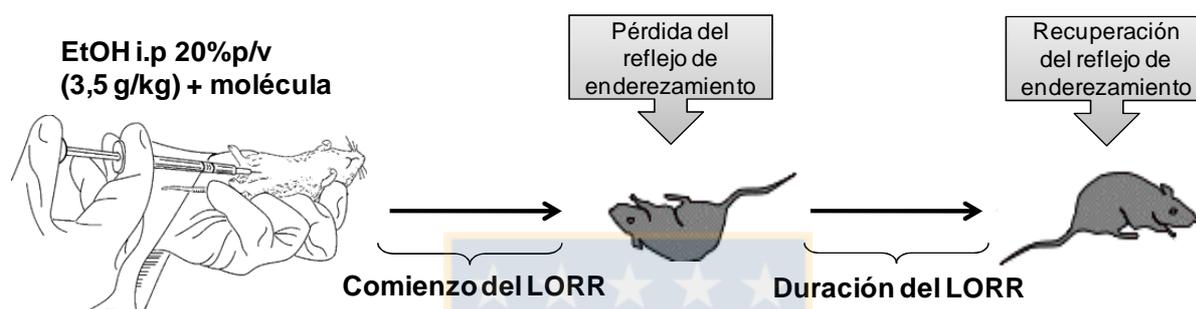
**2.2.8 Inmunocitoquímica:** una versión fluorescente del péptido RQHc7, el que fue previamente conjugado en el extremo C-terminal con el fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (para tal caso fue necesario la adición de una lisina (K) a la estructura de 7 péptidos), fue incubado en células HEK293 y se detectó mediante microscopía la localización de este péptido. Células HEK293 fueron fijadas con paraformaldehído (4%) por 5 minutos, permeabilizadas con Tritón X-100 (0,3%) por 30 minutos, incubadas con suero de caballo (10%) por 60 minutos y luego con anticuerpo primario anti-G $\beta$  (G $\beta$  – T20, rabbit, Santa Cruz Biotechnology) durante una hora a 4°C. El anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (Anti-rabbit, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) fue incubado durante una hora a una dilución de 1:200, además se adicionó DAPI como control nuclear. El montaje se

realizó con medio comercial (Fluorescence Mounting Medium, Dako Cytomation, Dako). Para el análisis cuantitativo, al menos 15 células fueron escogidas al azar usando un microscopio de alta resolución (Microscopio Súper-Resolución ELYRA S.1 (SR-SIM), Zeiss). Se analizó la colocalización del péptido fluorescente con el dímero G $\beta$  $\gamma$ .

## **2.3 ESTUDIOS EN ANIMALES: ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO**

**2.3.1 LORR (Loss of the Righting Reflex: pérdida del reflejo de enderezamiento):** La sensibilidad a los efectos depresores de etanol (3,5 g/kg) en ausencia y presencia de moléculas pequeñas se determinó utilizando el ensayo de LORR en ratones C57BL/6J machos (9 - 14 semanas). Etanol se diluyó a un 20% v/v en solución salina (0,9% NaCl). Ratones recibieron una inyección con etanol y luego de que los ratones se volvieron atáxicos, éstos fueron ubicados en posición supina en un receptáculo en forma de V (ángulo de 90°). La pérdida del LORR se define como la incapacidad de un ratón para enderezarse dentro de 30 segundos. El regreso del reflejo de enderezamiento es la habilidad que tiene un ratón de enderezarse dos veces en un periodo de 1 minuto. La duración del LORR (*sleep time*) se define como el tiempo transcurrido desde ubicar al ratón en posición supina hasta que el ratón recupera su reflejo de enderezamiento (Figura 5). La duración del LORR es usado como un índice de la depresión del sistema nervioso central. Durante todo el ensayo de LORR, la normotermia se mantuvo con la ayuda de una lámpara calefactora. Se determinó la capacidad de M554 de alterar

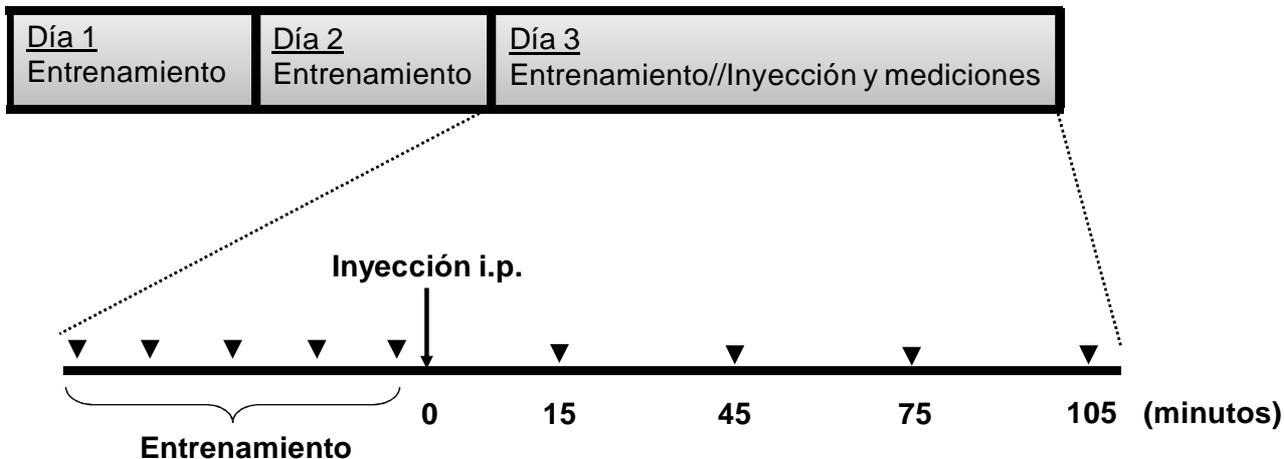
la duración del LORR inducido por etanol a diferentes concentraciones (50, 100, 200 mg/kg). Además se determinó la capacidad de M554 (100 mg/kg) de alterar la duración del LORR en un ratón KI, el cual es insensible al efecto de etanol debido a una mutación en el dominio intracelular del GlyR (Aguayo et al. 2014).



**Figura 5. Esquema esquemático del ensayo de LORR.**

Se destacan dos de los parámetros a medir: Comienzo del LORR y Duración del LORR.

**2.3.2 Rotarod acelerado:** Se utilizó el ensayo de rotarod acelerado para testear la habilidad motora basal de ratones C57/BL6J machos. Brevemente, los ratones fueron ubicados en el aparato rotarod en reposo (IITC Life Science Inc, CA). Se tomó el tiempo con un temporizador cuando el aparato comenzó a acelerar desde 4 hasta 40 rpm en un tiempo de 120 segundos y se registró el tiempo de latencia a caer. Cada ratón fue testado 5 veces en Día 1, Día 2 y Día 3 (entrenamiento). En el Día 3 se inyectó salino o etanol (2,0 g/kg i.p.) en ausencia o en presencia de las moléculas M554 o M890 (100 mg/kg; i.p.) (Figura 6). Los resultados fueron analizados usando medidas repetidas de *two-way* ANOVA.



**Figura 6. Figura esquemática del protocolo usado en rotarod acelerado.**

Se destacan los días de entrenamiento (Día 1, 2 y 3) y tiempos de medición de la latencia a caer antes y después de la inyección intraperitoneal correspondiente (Día 3).

**2.3.3 Open Field:** se ensayó la actividad locomotora en ratones hembras C57/BL6J en ensayos de Open Field registrando con una cámara la trayectoria del animal y utilizando el software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL) para cuantificar esta actividad. Los ratones fueron inyectados con salino o etanol (1,0 g/kg; i.p.) en ausencia o presencia de las moléculas M554 o M890 (100mg/kg;i.p.) 10 minutos antes de ser ubicados en la arena. Se les permitió a los ratones explorar libremente la arena durante 30 minutos, durante el cual se registró la distancia total recorrida en intervalos de 5 minutos. Los resultados fueron analizados usando *two-way* ANOVA.

**2.3.4 Metabolismo de etanol:** se recolectaron muestras de sangre tomadas de la vena de la cola de ratones luego de 60 y 120 minutos de inyecciones intraperitoneales de etanol (3,5 g/kg) en ausencia o presencia de M554 (100 mg/kg). La concentración de etanol para cada muestra de sangre se determinó usando un analizador Analox AM1 Alcohol (Lunenburg, MA).

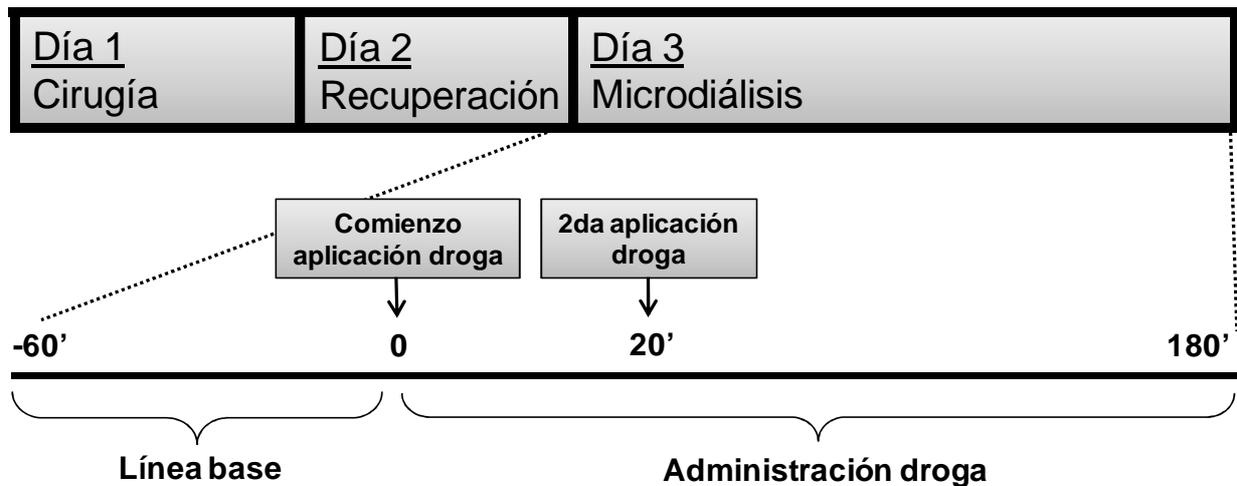
## **2.4 ESTUDIOS EN ANIMALES: MICRODIÁLISIS *IN VIVO***

**2.4.1 Implantación cánula en núcleo accumbens (nAc):** Los experimentos de microdiálisis fueron realizados en animales despiertos y con libertad de movimiento, como se ha descrito previamente (Waters et al. 1993). Las ratas Wistar fueron anestesiadas usando isofluorano antes de ser montadas en un instrumento de estereotaxia para la cirugía. Las cánulas son posicionadas en el nAc monolateralmente de acuerdo a las coordenadas obtenidas desde Paxinos y Watson (1986) (A/P +1.85, L/M -1.4, V/D -7.8, relativo a bregma). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con cemento Phosphatine (Dentalhuset, Suecia). Luego de la cirugía se permitió a las ratas recuperarse en jaulas separadas por dos días antes de los experimentos de diálisis (Figura 7).

**2.4.2 Microdiálisis in vivo:** Durante el día del experimento de diálisis, las ratas fueron conectadas a una bomba de microperfusión (CMA/100; Carnegie Medicine, Estocolmo, Suecia) y reubicadas en sus jaulas, donde se permitió el libre movimiento de éstas. Muestras de 40 µl fueron recolectadas cada 20 minutos e

inyectadas en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica para determinar los niveles de DA (Figura 7). El medio de perfusión fue solución Ringer. Se usó un estándar externo de 2,64 fmol/l de dopamina para verificar el *peak* de DA en el cromatograma. Los experimentos de microdiálisis consistieron en perfusión de Ringer por 90 minutos para obtener un balance del intercambio de fluidos en la membrana semipermeable de la cánula. Continuando con este mismo equilibrio se recolectaron muestras durante 60 minutos para establecer la línea base. Cuando se hubo establecido la línea base, se administró localmente el compuesto (M554 o estricnina) en el nAc durante 60 minutos con la correspondiente recolección de muestras. Esto fue seguido por perfusión con etanol o M554, respectivamente. Para el caso de los experimentos de aplicación sistémica de compuesto, inyecciones intraperitoneal fueron aplicadas (M554 o etanol) al minuto 0 y 60. Las muestras se recolectaron por un tiempo de 120 minutos adicionales (Figura 7).

Luego de realizado los experimentos, los animales fueron sacrificados mediante decapitación, los cerebros fueron seccionados para determinar la posición de la cánula de microdiálisis. Solo los animales con cánulas correctamente posicionadas fueron incluidos en los análisis estadísticos.



**Figura 7. Figura esquemática de los estudios de determinación de niveles de dopamina extracelular en nAc de ratas.**

Se señala el tiempo durante el cual se aplicaron los compuestos, ya sea mediante aplicación local o inyección i.p., y el tiempo correspondiente a la línea base y la administración de compuesto.

**2.4.3 Análisis de datos:** Las corrientes obtenidas en los ensayos de patch clamp fueron adquiridas y analizadas usando el programa Clampex 9.2 y MiniAnalysis (Axon Instruments). Para el análisis estadístico, se utilizó el software Origin 6.0 (Microcal). Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  error estándar y analizados mediante one-way ANOVA o two-way repeated ANOVA seguido de análisis *post hoc* según corresponda, en donde los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Péptido pequeño RQHc7 como inhibidor de la potenciación por etanol de GlyRs sinápticos

Entender los mecanismos mediante el cual etanol ejerce su efecto sobre el sistema nervioso central ha sido motivo de estudio durante varias décadas. Lo que se conoce hasta ahora en relación al mecanismo mediante el cual etanol modula al GlyR a través de un mecanismo intracelular (Yevenes et al. 2008), ayuda a comprender la importancia de utilizar esta vía para revertir los efectos que produce el alcohol, sin interferir con la actividad basal del receptor. Distintos estudios se han enfocado en utilizar la estrategia de interferir con la interacción proteína-proteína mediante el uso de péptidos o moléculas pequeñas con el objetivo de inhibir la activación o modulación de alguna proteína en particular (Kazi et al. 2011; Souroujon and Mochly-Rosen 1998).

Ya se ha estudiado previamente en nuestro laboratorio el efecto inhibitorio que produce el péptido RQHc7 sobre el dímero  $G\beta\gamma$ , en la potenciación por etanol del GlyR (San Martín et al. 2012). En este estudio se determinó además el sitio de unión y los aminoácidos importantes en  $G\beta$  necesarios para la interacción del péptido a esta proteína en estudios *in silico*. A pesar de que estos resultados han permitido la obtención de un péptido capaz de inhibir el efecto de etanol en el GlyR, se hace necesario conocer con mayor detalle la naturaleza de la interacción entre GlyR y  $G\beta\gamma$ , y estudiar con más detalle ciertas características del péptido RQHc7,

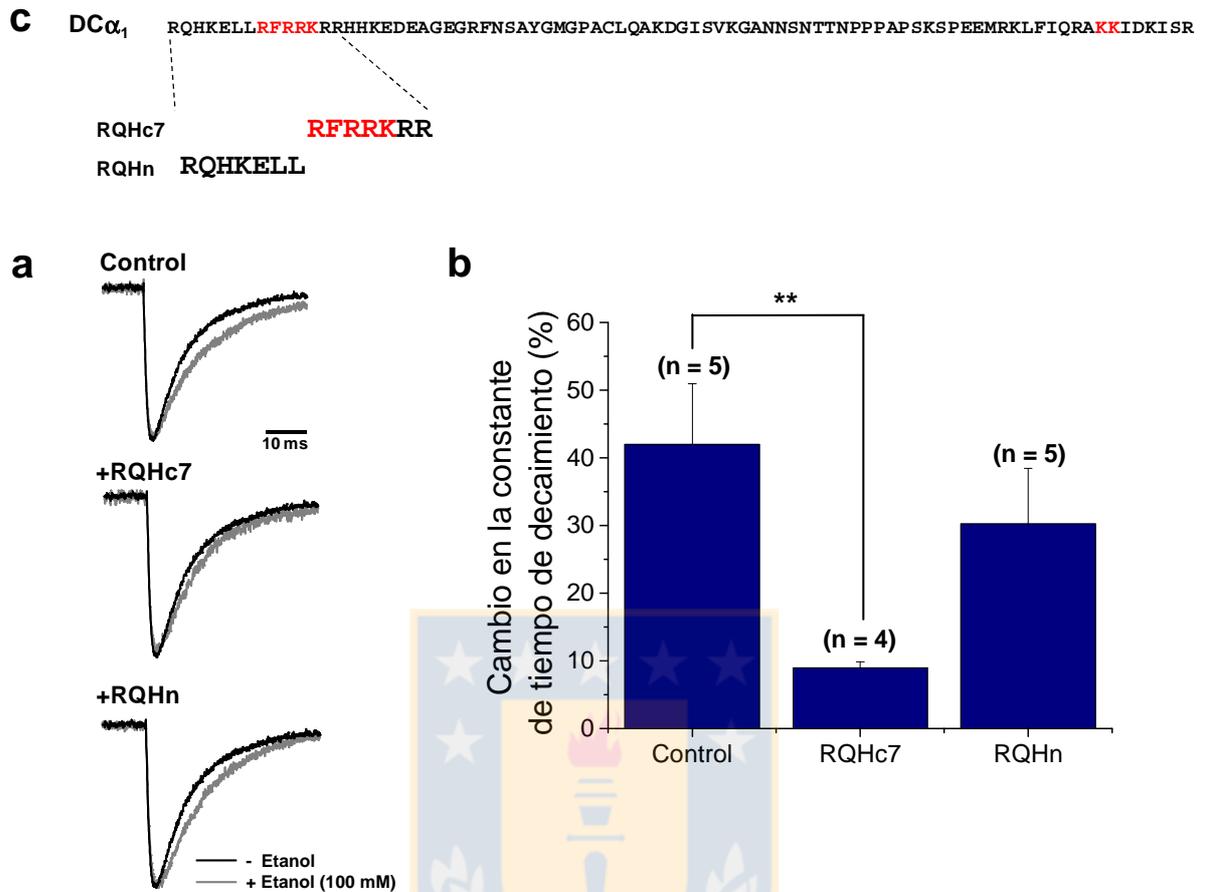
de tal forma de poder mejorar y re-diseñar nuevos péptidos inhibitorios a futuro. Hasta ahora, se han obtenido datos *in silico* acerca del tipo de interacción y de la importancia de ciertos aminoácidos en particular. Sin embargo, no se cuenta con datos *in vitro* que puedan apoyar estos resultados. Es por ello que la presente sección tiene como finalidad desarrollar el objetivo específico de **“Realizar una caracterización del efecto del péptido RQHc7 en transmisión sináptica, su especificidad y su localización celular”**. Utilizando técnicas electrofisiológicas y experimentos de fluorescencia se analizó la especificidad del péptido RQHc7 y la importancia de los aminoácidos que creemos interactúan con el GlyR presentes en G $\beta$ ,y que son fundamentales para el efecto modulador del GlyR.

### **3.1.1 Efecto del péptido RQHc7 en corrientes postsinápticas glicinérgicas espontáneas en presencia de etanol.**

Previamente se había determinado que el péptido RQHc7 es capaz de interferir con la potenciación del GlyR inducida por 100 mM de etanol, sin embargo no se conoce cuál es el efecto que tiene este péptido en las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) glicinérgicas espontáneas. Para determinar el efecto que tiene el péptido RQHc7 en los distintos parámetros obtenidos luego de analizar las IPSCs, se aislaron farmacológicamente las corrientes glicinérgicas de neuronas espinales en cultivo de 13-16 DIV mediante la aplicación de CNQX (4  $\mu$ M) y bicuculina (4  $\mu$ M) a la solución externa para bloquear los receptores AMPA y GABA<sub>A</sub> respectivamente. También se agregó TTX (100 nM) para bloquear la transmisión sináptica generada por potenciales de acción. De esta forma, con la

utilización de pipetas móviles colocadas a 100  $\mu\text{m}$  de la célula se perfundió con solución externa con 100 mM de etanol para determinar cómo son afectadas las corrientes sinápticas en presencia de este modulador. Al analizar la constante de tiempo de decaimiento de las corrientes glicinérgicas, se encontró que etanol provocó un aumento de un  $42\pm 9\%$ , el cual fue revertido luego de 15 minutos de difusión intracelular con 200  $\mu\text{M}$  del péptido RQHc7 obteniéndose un valor de  $9\pm 1\%$  de cambio en esta constante, diferencia que fue significativa. Al aplicar intracelularmente 200  $\mu\text{M}$  del péptido RQHn, el cual no contiene los aminoácidos básicos importantes, el aumento inducido por 100 mM etanol en la constante de tiempo de decaimiento no varió significativamente con respecto al control sin péptido ( $30\pm 8\%$ ; Figura 8).





**Figura 8. Inhibición de los efectos de etanol en la constante de tiempo de decaimiento por péptidos pequeños.**

**(a)** Trazo representativo de mIPSC glicinérgicas aisladas desde actividad sináptica de neuronas espinales en cultivo registradas en ausencia (trazos negros) y presencia de etanol (100 mM, trazos grises) y RQHc7 o RQHn (200  $\mu$ M cada uno, aplicado intracelularmente). **(b)** Porcentaje de variación de la constante de decaimiento inducida por etanol en presencia y ausencia de los péptidos indicados. En ausencia de péptido (control), etanol induce un incremento en la constante de tiempo de decaimiento. Luego de 15 minutos de aplicación intracelular de RQHc7 (200  $\mu$ M), este aumento se redujo significativamente. La aplicación de RQHn (200  $\mu$ M) no redujo significativamente el aumento en la constante de tiempo de decaimiento inducido por etanol. (\*\* ANOVA,  $p < 0,01$ ).

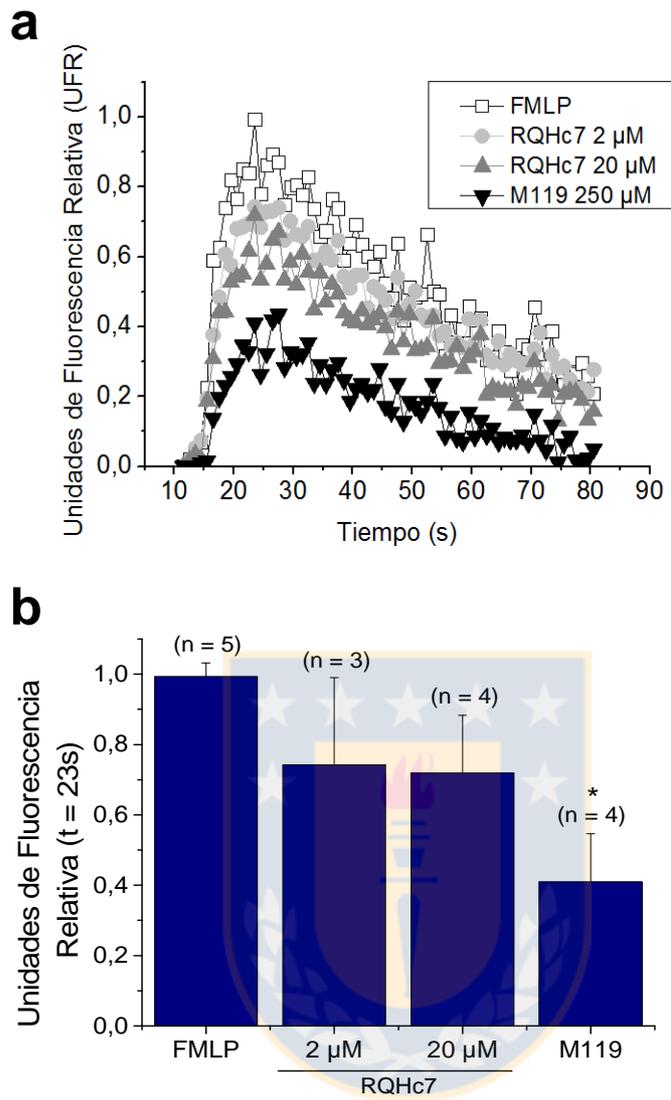
### **3.1.1.1 Péptidos pequeños no interfieren con la vía de señalización GIRK-G $\beta\gamma$ , ni altera la activación de PLC $\beta$ 2 mediada por G $\beta\gamma$ .**

El dímero G $\beta\gamma$  proveniente de la activación de la proteína G heterotrimérica modula una variedad de efectores, que van desde proteínas de membrana hasta enzimas solubles, todo esto mediante interacciones directas entre G $\beta\gamma$  y el efector (Clapham and Neer 1997). En la estructura del dímero G $\beta\gamma$  se ha observado la presencia de una región común para la unión de distintos efectores, denominada por algunos autores como “hot spot” (Scott et al. 2001). Esta región puede ser eventualmente bloqueada por péptidos o moléculas pequeñas, y así impedir la activación de ciertos efectores por parte de G $\beta\gamma$ , interfiriendo con la interacción proteína-proteína (Bonacci et al. 2006; Smrcka, Lehmann, and Dessal 2008). Diversos estudios se han enfocado en encontrar moléculas pequeñas que sean capaces de interferir con esta unión, tal como la molécula M119 desarrollada por Smrcka et al (Bonacci et al. 2006). Un factor clave en la búsqueda de nuevas moléculas es la especificidad de éstas en la inhibición de la activación de ciertos efectores por parte de G $\beta\gamma$ . En este trabajo de tesis, analizamos el efecto de RQHc7 en dos efectores de G $\beta\gamma$ : *fosfolipasa C $\beta$*  y *canales de calcio de tipo GIRK*.

Tal como lo demuestran los resultados previos, el péptido RQHc7 disminuye significativamente la potenciación mediada por G $\beta\gamma$  del GlyR por etanol. Sin embargo, no se conoce si esta acción es específica hacia este receptor en particular. Debido que el heterodímero G $\beta\gamma$  presenta una gran variedad de efectores, tales como PI3K, PLC, GIRK, etc., es necesario evaluar el efecto que tendría el péptido RQHc7 sobre la actividad de estos efectores.

- *RQHc7 no interfiere con la vía de señalización de PLCβ2*

Una de las formas de activación de la vía de señalización de PLCβ2 es a través del dímero Gβγ. La activación de este efector provoca un aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular promoviendo distintos procesos celulares. El agonista fMLP (Formil-metionil-leucil-fenilalanina), al unirse al receptor acoplado a proteína Gi/o, provoca la disociación del heterotrímero Gαβγ, induciendo que el dímero Gβγ se una a PLCβ, activándola (Lew et al. 1986). Esta enzima posteriormente hidroliza PIP2; en DAG e IP3, ambos actuando como segundos mensajeros. La liberación de IP3 al citoplasma induce la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplásmico provocando el incremento de este catión en el citoplasma. Usando este sistema de señalización en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos, se procedió a ensayar la capacidad de RQHc7 de inhibir la activación de PLCβ y por ende la liberación de Ca<sup>2+</sup>. Usando la sonda sensible a Ca<sup>2+</sup> Fluo-8 fue posible determinar la activación de este efector en respuesta a fMLP. Los resultados indicaron que 2 y 20 μM de péptido no interfieren significativamente con la activación de PLCβ2 (Vehículo: 99±4%; RQHc7 (2 μM): 74±4% y RQHc7 (20 μM): 72±16%; Figura 9). Esto indica que el péptido estudiado no interfiere con la activación de PLCβ2, debido a que el sitio de unión de este péptido en Gβ no coincide con el de PLCβ2. Adicionalmente, 250 μM de la molécula M119 fue usada como control positivo por su capacidad para inhibir la activación de PLCβ2 por Gβγ, tal como ha sido demostrado en estudios anteriores (Bonacci et al. 2006).



### Figura 9. Activación de PLC $\beta$ 2 mediado por G $\beta$ $\gamma$

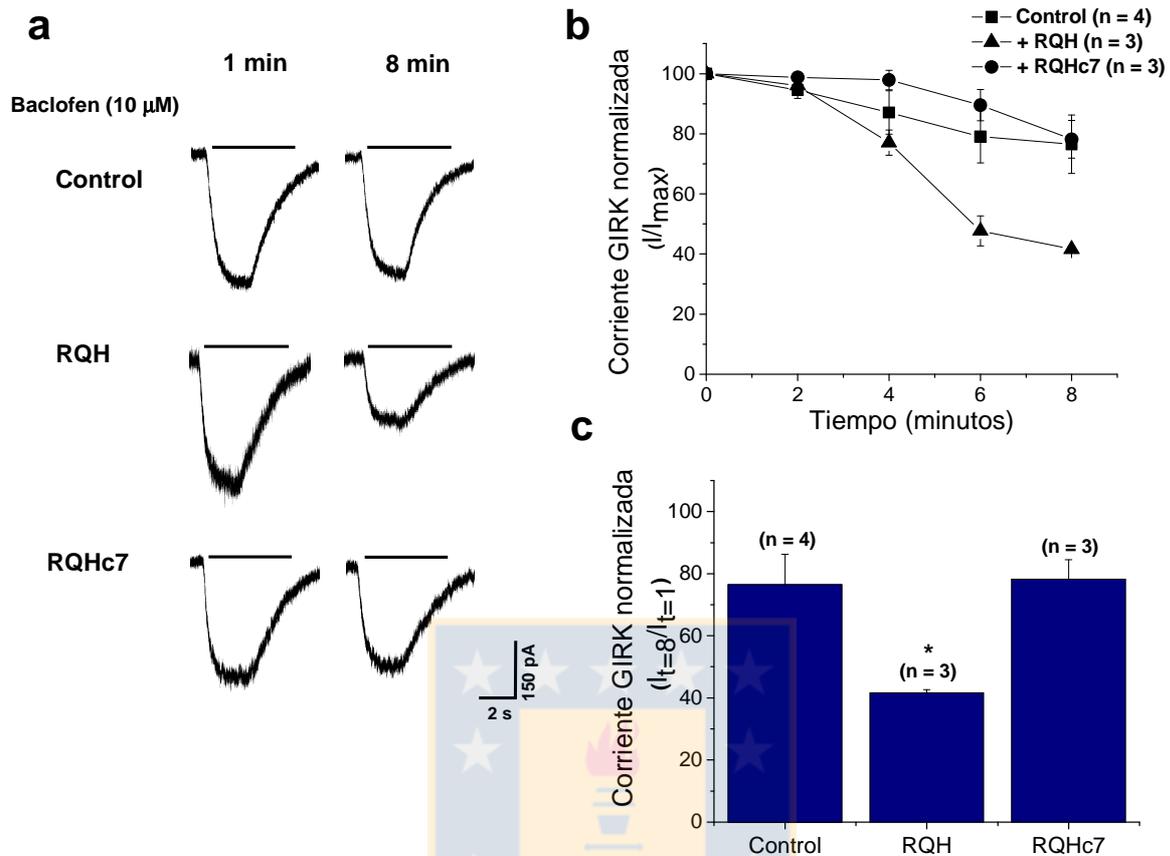
Células HL60 fueron incubados con el péptido RQHc7 y la molécula M119 en presencia del agonista fMLP (5 $\mu$ M). Para la medición de Ca<sup>2+</sup> citosólico las células fueron previamente tratadas con la sonda fluorescente Fluo8. La fluorescencia producida por la unión de Ca<sup>2+</sup> a esta sonda fue monitoreada a 485/520 nm durante 80 segundos. **(a)** Representación gráfica de la fluorescencia registrada luego de la incubación por 15 minutos con 2 y 20  $\mu$ M del péptido RQHc7 y 250  $\mu$ M de la molécula M119. **(b)** La gráfica representa los niveles de fluorescencia en el punto máximo correspondiente a 23 segundos para cada condición estudiada. Los valores representan el promedio  $\pm$  error (\* ANOVA, p < 0,05).

- *Péptido RQHc7 no interfiere con la activación mediada por  $G\beta\gamma$  del canal GIRK*

En el presente trabajo también se evaluó el efecto que tiene el péptido RQHc7 sobre la capacidad de interferir con la activación del canal de potasio rectificador activado por proteína G (GIRK). La activación del receptor  $GABA_B$  ( $GABA_B$ -R), un receptor acoplado a proteína G (GPCR), activa a la proteína heterotrimérica  $G_i$ , liberando el heterodímero  $G\beta\gamma$ , el cual puede modular la actividad de los canales de potasio rectificadores activados por proteína G (GIRK) (Padgett and Slesinger 2010). Bajo condiciones normales la estimulación de receptores  $GABA_B$  con  $10 \mu M$  de baclofen, un agonista específico del  $GABA_B$ R, induce una corriente de  $K^+$  que es sostenida en el tiempo. En estudios previos se había comprobado el efecto inhibitorio del péptido RQH sobre las corrientes de  $K^+$  evocada por baclofen, demostrándose que luego de 16 minutos la activación del canal estaba disminuida (Guzman et al. 2009). En el presente estudio se co-expresó en células HEK293 el receptor  $GABA_B$  ( $GABA_{B1}$  y  $GABA_{B2}$ ) y el canal iónico permeables a  $K^+$  (GIRK1 y GIRK4)(White et al. 1998; Jones et al. 1998), con el objetivo de estudiar los efectos del péptido RQHc7 en la activación de este canal. Se pudo observar que luego de 8 minutos de difusión intracelular con  $200 \mu M$  de péptido RQHc7 no fue afectada la activación del canal GIRK por baclofen ( $78 \pm 6\%$ , Figura 10b y c). Utilizando como control  $200 \mu M$  del péptido RQH se observó que este péptido si fue capaz de interferir significativamente con la activación de este canal luego de 8 minutos de difusión intracelular ( $41 \pm 1\%$ , Figura 10b y c).

Todos estos resultados indican que el péptido RQHc7 interfiere con la potenciación inducido por etanol del GlyR en modelo de neuronas espinales, y que además no interfiere con la activación de otros efectores de  $G\beta\gamma$  como PLC $\beta$ 2 y canales de potasio de tipo GIRK.





**Figura 10. Efecto del péptido RQHc7 en la activación de GIRK mediada por  $G\beta\gamma$ .**

Células HEK293 que coexpresan  $GABA_B$  y GIRK fueron registradas mediante electrofisiología aplicando intracelularmente los péptidos que se indican. Se perfundió con baclofen (10  $\mu$ M) cada dos minutos registrándose las corrientes de  $K^+$  generadas por activación del canal. **(A)** Trazos representativos de corrientes de  $K^+$  de canales GIRK obtenidos por estimulación con baclofen al minuto 1 y 8. **(B)** Curso temporal de las corrientes de  $K^+$  activadas por baclofen en ausencia de péptido (cuadrado), presencia de 200  $\mu$ M de RQH (triángulos) y 200  $\mu$ M de RQHc7 (círculo) **(C)** Representación gráfica de corrientes normalizadas de  $K^+$  activadas por baclofen al minuto 8 con respecto a la corriente inicial en ausencia de péptido, en presencia del péptido RQH o del péptido RQHc7 según se indica. Los valores representan el promedio  $\pm$  error (\* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.1.2 Ubicación celular y distribución del péptido RQHc7

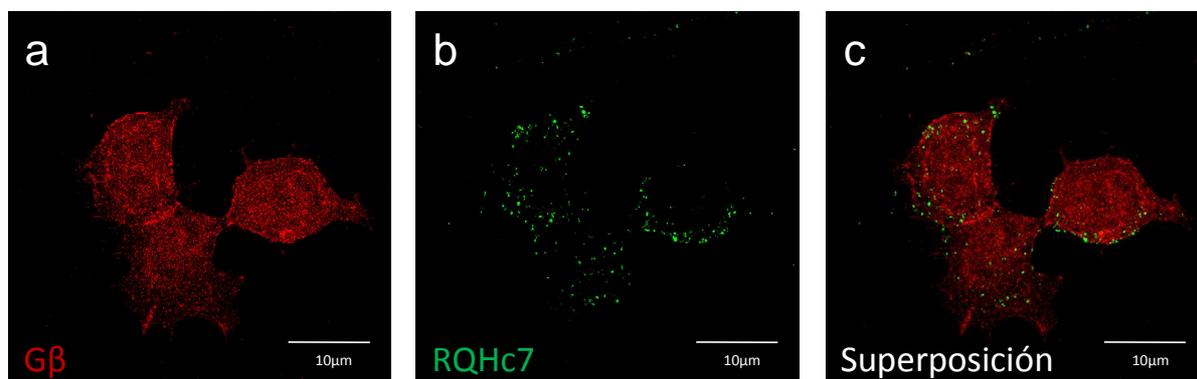
Mediante estudios *in silico* se ha determinado que el péptido RQHc7 es capaz de unirse a  $G\beta\gamma$ , mientras que ensayos de interacción demostraron que el péptido es capaz de interferir con la interacción GlyR- $G\beta\gamma$  (San Martín et al. 2012), sin embargo hasta ahora no se ha demostrado una interacción entre RQHc7 y  $G\beta\gamma$  en un contexto celular.

Como una manera más detallada de estudiar la interacción entre el péptido RQHc7 y el dímero  $G\beta\gamma$ , se realizaron experimentos de inmunocitoquímica en células HEK293, usando una versión fluorescente del péptido. Para ello se utilizó el péptido conjugado con el fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) en su extremo C terminal. Para enlazar el FITC a la cadena peptídica original se incorporó un aminoácido de lisina (K). Por lo tanto, la configuración de cada péptido fue: péptido-lisina-FITC. Se utilizó una concentración de 40  $\mu$ M del RQHc7-FITC durante 1 hora, de acuerdo a estudios previos con péptidos fluorescentes (Peters et al. 2013). Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo contra  $G\beta$  y el fluoróforo FITC fusionado al péptido RQHc7.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía láser de súper resolución fueron tomadas con “*stacks*” de hasta 5  $\mu$ m de profundidad y dos planos focales distintos. En la figura 11 se muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía en donde (a) representa el marcaje de la subunidad  $\beta$  en color rojo, visualizándose una amplia distribución de la proteína. La imagen (b) representa la distribución de RQHc7 en verde, mientras que (c) corresponde a la superposición de las dos imágenes anteriores. De acuerdo con estas imágenes se observa un bajo nivel de

solapamiento de las señales fluorescentes de  $G\beta\gamma$  y el péptido RQHc7, lo que puede ser debido a una baja interacción entre el péptido y la proteína. Para cuantificar esto se realizó un análisis del coeficiente de correlación de Manders (M1) entre RQHc7 fluorescente y  $G\beta\gamma$ , cuyo valor indica un solapamiento de las señales y se considera que representa el grado de colocalización (Zinchuk and Grossenbacher-Zinchuk 2009). En este estudio se determinó que el valor de este coeficiente fue de  $0,40\pm 0,02$ , un valor que implica que colocaliza el 40% de los dos canales seleccionados.





**Coefficiente de Manders (M1) =  $0,40 \pm 0,02$**

**Figura 11. Ubicación celular y distribución del péptido RQHc7 en células HEK293.**

Cultivos de células HEK 293 fueron incubadas durante 1 hora con  $40 \mu\text{M}$  del péptido RQHc7 (RFRRKRR) conjugado con el fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (FITC, verde). Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) y para el marcaje del dímero  $G\beta\gamma$  se utilizó el anticuerpo primario  $G\beta$  (T-20) rabbit polyclonal IgG/anticuerpo secundario Cy3 donkey anti rabbit IgG (rojo). **(a)** Imágenes confocales de la presencia del dímero  $G\beta\gamma$  **(b)** Presencia del péptido RQHc7 en las mismas células de (a) **(c)** Las imágenes fueron superpuestas para visualizar el nivel de solapamiento entre las señales del péptido RQHc7 y  $G\beta\gamma$ .

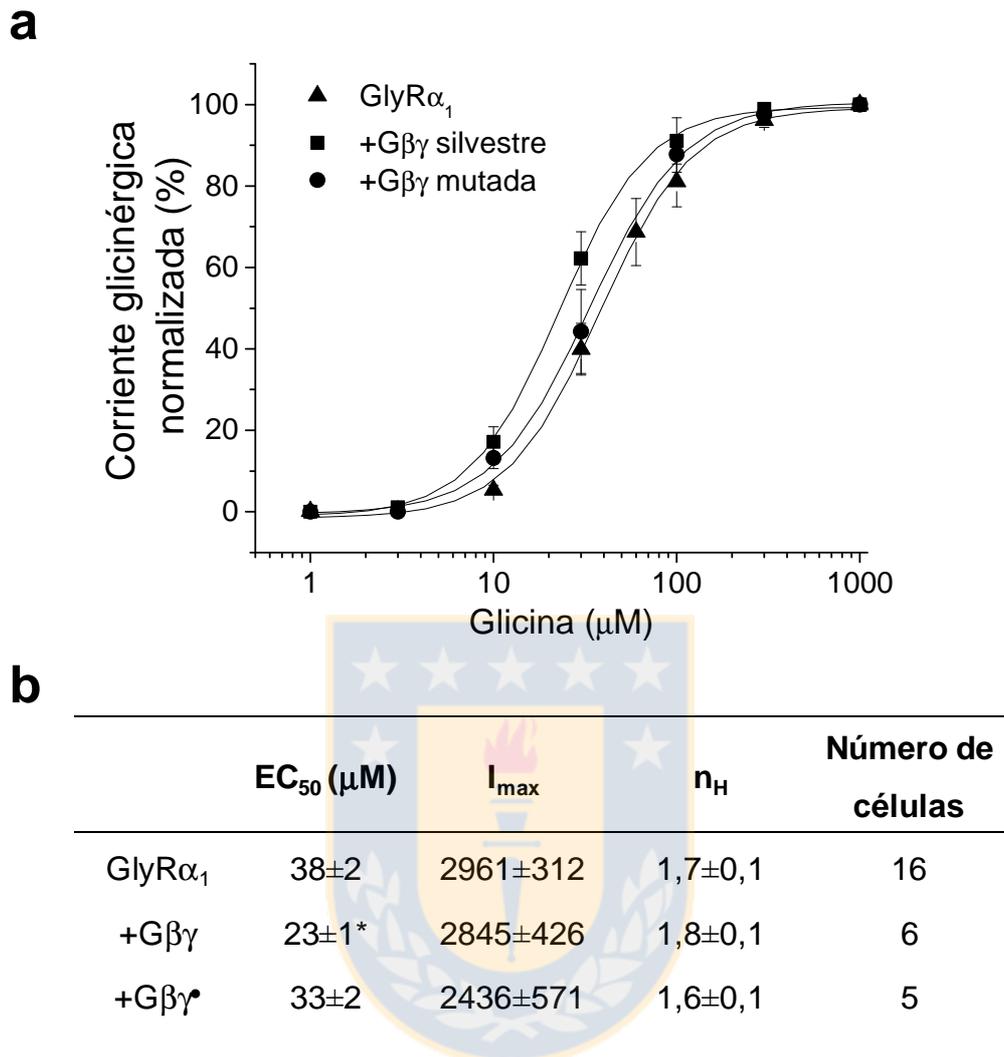
### **3.1.3 Mutaciones en residuos importantes en G $\beta$ altera la modulación tónica inducida por sobreexpresión del dímero G $\beta_1\gamma_2$ en GlyR**

Al referirse a la modulación de canales iónicos por G $\beta\gamma$ , estudios previos han determinado que la sobreexpresión de este dímero induce el fenómeno de modulación tónica en canales de calcio activados por voltaje (VGCC) (Ikeda 1996; Ruiz-Velasco and Ikeda 2000), en canales GIRK (Krapivinsky et al. 1998) y en el GlyRs (Yevenes et al. 2003). Estudios de nuestro laboratorio han determinado que el aumento en la disponibilidad de G $\beta\gamma$  libre produce una modulación estable del canal, el cual en el caso del GlyR se refleja en un desplazamiento a la izquierda de la curva concentración-respuesta a glicina, obteniéndose un EC<sub>50</sub> menor al obtenido en condiciones basales (Yevenes et al. 2003).

Como una forma de complementar los resultados obtenidos hasta ahora y con el objetivo de determinar los residuos de G $\beta\gamma$  importantes para la modulación del GlyR, se realizaron curvas concentración-respuesta en células HEK293 que sobreexpresaban  $\alpha_1$ GlyRs y el dímero G $\beta_1\gamma_2$  silvestre (G $\beta\gamma$ ) o con mutaciones (G $\beta\gamma^*$ ) en los aminoácidos D186A, D288A y D246A en G $\beta$ , los cuales se determinó en estudios previos mediante ensayos *in silico* son importantes para la unión del péptido RQHc7 (San Martin et al. 2012). Tal como se ha reportado previamente (Yevenes et al. 2003), la sobreexpresión del dímero G $\beta\gamma$  silvestre fue capaz de desplazar la curva concentración-respuesta del GlyR hacia la izquierda, disminuyendo el valor del EC<sub>50</sub> a 23 $\pm$ 1  $\mu$ M. Cuando se sobreexpresó la subunidad G $\beta\gamma$  mutada se encontró que la curva concentración-respuesta se desplazó levemente a la izquierda, en donde el EC<sub>50</sub> disminuyó sólo a un 33 $\pm$ 2 $\mu$ M (Figura

12a). La modulación tónica inducida por la sobreexpresión de  $G\beta\gamma$  no modificó los parámetros de corriente máxima y número de Hill. En la Figura 12b se detalla los valores de  $EC_{50}$ , coeficiente de Hill, corriente máxima ( $I_{max}$ ) y número de células generados en presencia de subunidad  $G\beta$  silvestre y mutada. Estos resultados nos indican que los residuos Asp186, Asp228 y Asp246 son fundamentales para los efectos funcionales de  $G\beta\gamma$  sobre el  $GlyR\alpha_1$ .





**Figura 12. Curva concentración-respuesta obtenida de GlyR $\alpha_1$  en respuesta a la sobreexpresión de G $\beta_1\gamma_2$  silvestre y mutado.**

**(a)** Análisis concentración-respuesta de corrientes glicinérgicas en células HEK293 que sobreexpresan GlyR $\alpha_1$  y G $\beta\gamma$  silvestre (G $\beta\gamma$ ) o G $\beta\gamma$  mutante (G $\beta\gamma^*$ ) (D186A, D288A, D246A). Se observó un desplazamiento de la curva hacia la izquierda en presencia de G $\beta\gamma$  silvestre. **(b)** Propiedades funcionales del GlyR en presencia de G $\beta$  silvestre (G $\beta\gamma$ ) o mutada (G $\beta\gamma^*$ ). En el análisis estadístico sólo se comparó la condición control (sin sobreexpresión de G $\beta$ ) versus sobreexpresión de G $\beta$ , el cual mostró diferencias significativas en el  $EC_{50}$  (\* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### **3.2 Identificación de moléculas pequeñas inhibidoras de la potenciación del GlyR por etanol.**

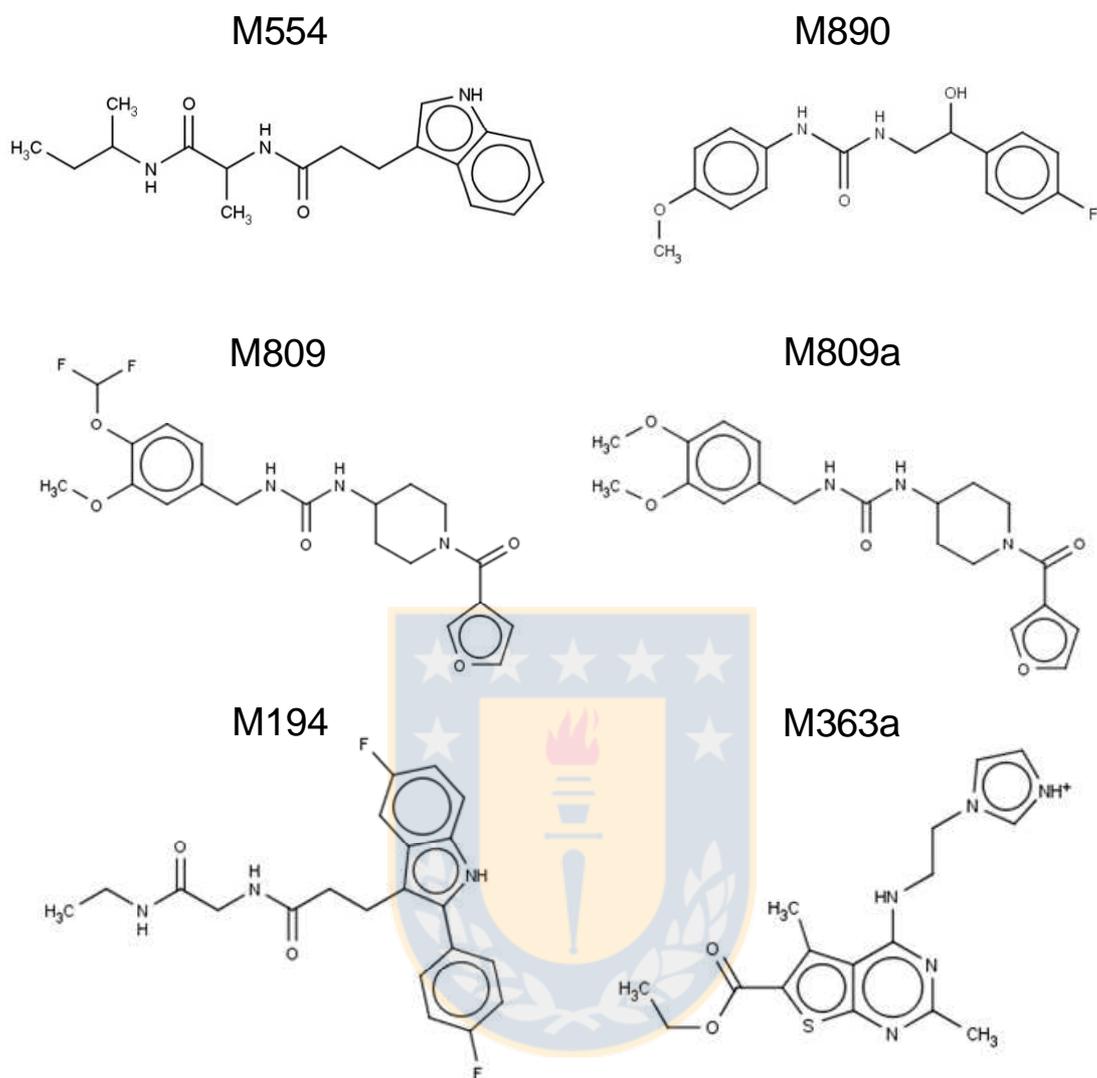
La búsqueda de compuestos con fines terapéuticos implica la obtención de moléculas que presenten características favorables para su uso en modelos animales. El estudio del péptido RQHc7 ha dado resultados favorables en cuanto a su capacidad inhibitoria sobre los efectos de etanol en el GlyR. Sin embargo, una molécula peptídica no es un buen candidato como potencial fármaco. Para obtener compuestos que cumplan con los requisitos farmacológicos apropiados para ser una molécula líder (Leeson 2012), en nuestro laboratorio se realizó previamente un screening virtual con el objetivo de obtener moléculas que reproduzcan el efecto de los péptidos RQH en la potenciación por etanol del GlyR. A partir del screening virtual realizado en base a la interacción RQHc7-G $\beta\gamma$ , se seleccionaron 6 moléculas pequeñas con los puntajes de docking más favorables (Tabla 1). El puntaje de docking se basa en términos relacionados con las fuerzas de Van der Waals energía potencial electrostática, hidrofobicidad, puentes de hidrógeno, uniones con metales, presencia de grupos polares enterrados, enlaces rotables fijos e interacciones polares, y debido a que estos valores son negativos, el menor puntaje corresponderá al mejor valor. En la figura 13 se representa la estructura bidimensional de las moléculas seleccionadas utilizando el programa computacional MarvinSketch (ChemAxon, 2013). Dichas moléculas, las cuales fueron adquiridas en forma comercial, presentan grupos químicos en común, como la presencia de grupos urea, indol, metoxifenil y amida. Estos grupos serían

relevantes en la unión con G $\beta$  y en el efecto inhibitor sobre la potenciación del GlyR por etanol. En la tabla 1 se detalla además el nombre IUPAC para cada una de estas moléculas, destacándose el nombre de los grupos químicos más relevantes.

Considerando todos estos antecedentes previos, en esta sección se examinó el objetivo específico de **“Identificar moléculas pequeñas no peptídicas que interfieran con la potenciación del GlyR por etanol”**. Utilizando técnicas electrofisiológicas y ensayos de comportamiento animal, se determinó el efecto inhibitorio de estas moléculas en revertir los efectos que produce etanol en modelos *in vitro* e *in vivo*.

**Tabla 1. Nombre IUPAC y puntaje de docking de las moléculas obtenidas mediante screening virtual**

<b>Molécula</b>	<b>Nombre</b>	<b>Puntaje Docking</b>
M554	N-(butan-2-il)-2-[3-(1H- <b>indol</b> -3-il)propanamido] <b>propanamida</b>	-1,9
M890	1-[2-(4-fluorofenil)-2-hidroxietil]-3-(4- <b>metoxifenil</b> ) <b>urea</b>	-1,34
M809	3-{{4-(difluorometoxi)-3- <b>metoxifenil</b> }}metil}-1-[1-(furan-3-carbonil)-4-piperidil] <b>urea</b>	-1,1
M809a	1-[[3,4-dimetoxi-fenil]metil]-1-[1-(furan-3-carbonil)-4-piperidil] <b>urea</b>	-2,73
M194	N-(etilcarbamoilmetil)-3-[5-fluoro-2-(4-fluorofenil)-1H-indol-3-il]- <b>propanamida</b>	-1,5
M363a	1-(2-{{6-(etoxicarbonil)-2,5-dimetiltieno[2,3-d]pirimidin-4-il}amino}etil)-1H-imidazol-3-ium	-2,13



**Figura 13. Estructura bidimensional de 6 moléculas obtenidas mediante screening virtual.**

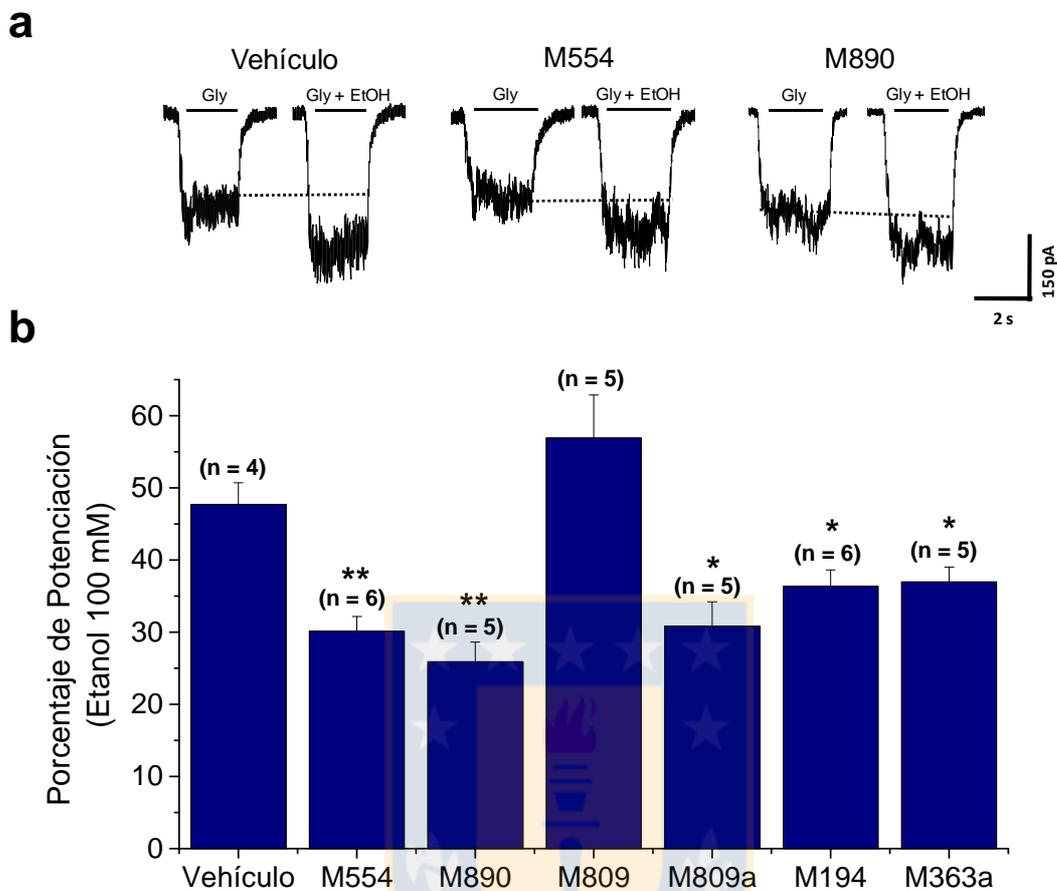
El diseño bidimensional se logró usando el programa computacional MarvinSketch (ChemAxon, 2013).

### 3.2.1 Las moléculas pequeñas M554 y M890 inhiben la potenciación por etanol del GlyR

Con el objetivo de determinar la capacidad inhibitoria de los compuestos seleccionados sobre la potenciación por etanol del GlyR se utilizaron estudios electrofisiológicos utilizando células HEK293 transfectadas con GlyR $\alpha_1$ . Se registraron corrientes evocadas por co-aplicación de glicina a una concentración que produce una respuesta de un 10% del efecto máximo (EC<sub>10</sub>: 15  $\mu$ M) junto con 100 mM de etanol. Los resultados se expresaron como porcentaje de potenciación luego de 15 minutos de difusión de la molécula en el citoplasma. Como se ha demostrado previamente en nuestro laboratorio, 100 mM de etanol potenció las corrientes evocadas por glicina en un 48 $\pm$ 3% (Figura 14). Las moléculas aplicadas intracelularmente inhibieron la potenciación del GlyR por etanol. Esta inhibición fue significativa para algunas de las moléculas seleccionadas, obteniéndose una disminución significativa de la potenciación considerando un valor de  $p < 0,01$  para las moléculas M554 (30 $\pm$ 2%) y M890 (26 $\pm$ 3%), mientras que para un valor de  $p < 0,05$  el porcentaje de potenciación disminuyó significativamente en presencia de las moléculas M809a (31 $\pm$ 3%), M194 (36 $\pm$ 2%), M363a (34 $\pm$ 2%). Por otra parte, la aplicación de M809 no disminuyó el porcentaje de potenciación por etanol (56 $\pm$ 6%) (Figura 14). Cabe destacar que al analizar los registros de corrientes activados por glicina en ausencia de etanol en el minuto 1 y el minuto 15, no se encontraron diferencias en su amplitud, lo que indica que el efecto de las moléculas se debe a una alteración en la potenciación por etanol, y no en la corriente basal de glicina (datos no mostrados). Estos resultados indican que estas 5 moléculas son activas

en disminuir la potenciación por etanol del GlyR, las cuales se estarían uniendo al dímero  $G\beta\gamma$ , impidiendo la modulación del GlyR.



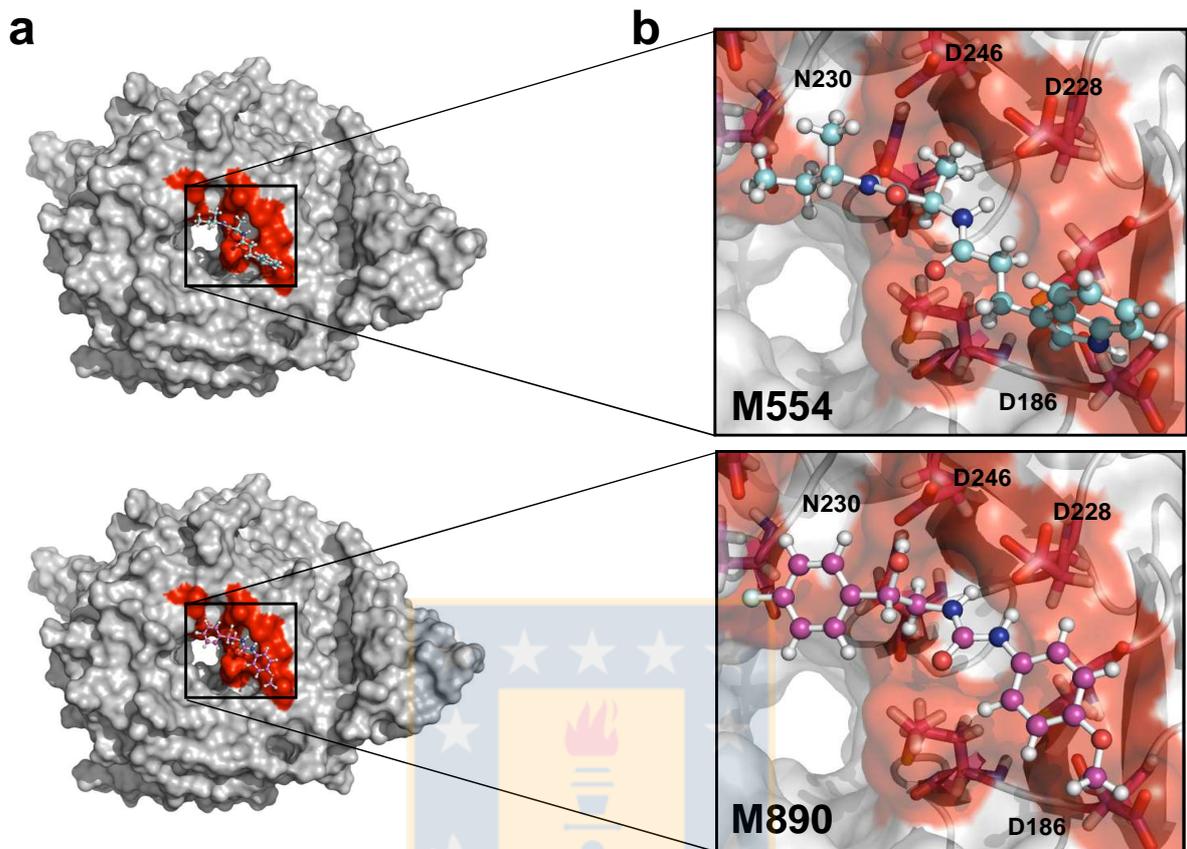


**Figura 14. Sensibilidad a etanol de  $\alpha_1$ GlyR en presencia de moléculas pequeñas obtenidas mediante screening virtual.**

Corrientes evocadas por glicina fueron registradas en células HEK293 que sobreexpresaban GlyRs en ausencia y presencia de etanol, luego de 15 minutos de difusión intracelular con las moléculas señaladas. **(a)** Trazos de corrientes evocadas por aplicación de glicina (15  $\mu$ M) en ausencia y presencia de etanol (100 mM) luego de 15 minutos de difusión intracelular con las moléculas M554 y M890 a una concentración de 200  $\mu$ M. **(b)** La gráfica resume el porcentaje de potenciación por etanol de las corrientes evocadas por glicina después de 15 minutos de aplicación intracelular de 200  $\mu$ M de las moléculas seleccionadas desde el screening virtual. Los valores representan el promedio  $\pm$  error. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (\* ANOVA,  $p < 0,05$ ; \*\* ANOVA,  $p < 0,01$ ).

### **3.2.1.1 Las moléculas pequeñas M554 y M890 interactúan con G $\beta$ a través de residuos de ácido aspártico**

Con el propósito de estudiar la interacción de M554 y M890 con G $\beta$  se realizó un análisis bioinformático de la unión de estas moléculas mediante docking molecular usando el programa computacional Glide (Schödingler, 2009). Los resultados permitieron conocer la posición predicha de los grupos químicos de las moléculas estudiadas con respecto a G $\beta$  (código PDB: 1TBG). Mediante el docking molecular se determinó que el grupo indol de M554 establece una interacción electrostática ion-dipolo con el grupo carboxilo de la Asp186. También es posible que este grupo indol forme una interacción de Van der Waals con Cys204. El grupo amida de M554 puede establecer tanto un enlace de hidrogeno o una interacción ion-dipolo con el grupo carboxilo de la Asp228 y Asp246. Para el caso de M890, el grupo urea establece un enlace de hidrogeno con el grupo carboxilo de la Asp228, y también forma una interacción ion-dipolo con Asp228 y Asp246. Además, el grupo hidroxilo de M890 tiene una posición y distancia adecuadas para establecer un enlace de hidrogeno con Asp246 (Figura 15). Con estos antecedentes se sugiere que los aminoácidos más importantes en G $\beta$  para la interacción con las moléculas pequeñas corresponden a los Asp186, Asp228 y Asp246, los cuales concuerdan con los aminoácidos importantes para la interacción de G $\beta$  con el péptido RQHc7 (Fabián Cerda, Tesis Bioingeniería, 2012). Por otro lado, los resultados de sobreexpresión del dímero G $\beta$  $\gamma$  silvestre y mutante presentados anteriormente apoyan nuevamente la importancia de estos aminoácidos para la interacción y modulación tónica del GlyR.

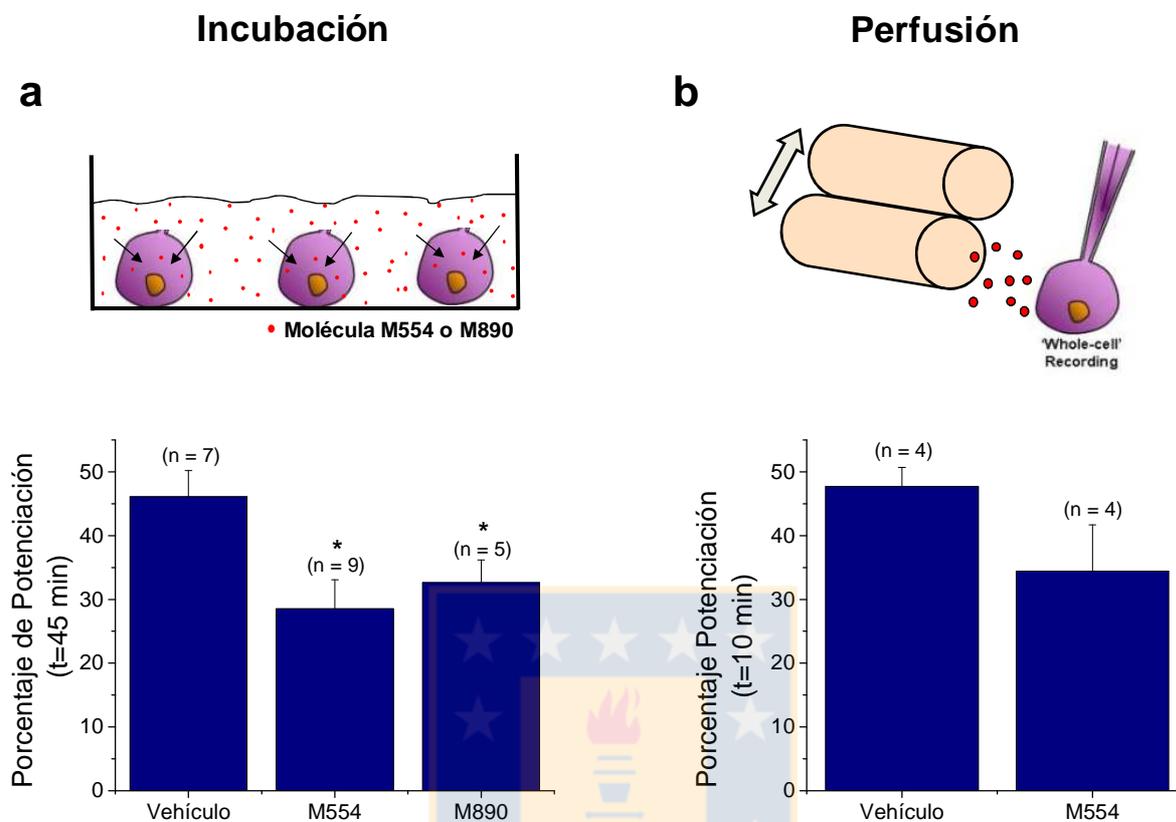


**Figura 15. Modelo de unión e interacción entre las moléculas seleccionadas y la superficie de  $G\beta\gamma$ .**

Mediante un estudio de docking molecular se determinó el sitio de interacción de las moléculas M554 y M890 sobre  $G\beta$  usando el programa Glide (Schrödinger, 2009). La estructura tridimensional de  $G\beta\gamma$  fue obtenida desde el sitio web del *Protein Data Bank* (código PDB: 1TBG) **(a)** Modelo predicho para la posición de interacción de las moléculas M554 y M890 con  $G\beta\gamma$ . **(b)** Detalle de la interacción de las moléculas pequeñas y  $G\beta\gamma$ . Se destacan los aminoácidos de  $G\beta$  importantes para la interacción con las moléculas indicadas, compuesto principalmente por ácidos aspárticos.

### 3.2.1.2 Las moléculas pequeñas M554 y M890 atraviesan la membrana plasmática de manera limitada

Para ensayar la capacidad de estas moléculas de atravesar la membrana plasmática, se realizaron dos aproximaciones. La primera de ellas consistió en incubar células HEK293 durante 45 minutos con las moléculas M554 o M890 a una concentración de 200  $\mu$ M para luego medir el porcentaje de potenciación por etanol (100 mM) del GlyR. De esta forma en la condición vehículo, se registró una potenciación de  $46\pm 4\%$  lo que concuerda con el obtenido en condiciones normales sin vehículo (Figura 16a). Cuando se incubó con M554 el porcentaje de potenciación fue de un  $29\pm 5\%$ , el cual fue significativamente distinto de la condición vehículo. Al realizar lo mismo con M890 se obtuvo un valor de  $33\pm 4\%$  el cual también fue significativamente menor con respecto al vehículo (Figura 16a). La otra aproximación que se realizó para ensayar la capacidad de las moléculas de ingresar a la célula fue la de perfundir durante 10 minutos con 200  $\mu$ M de M554 inmediatamente después de obtenida la configuración *whole cell*, por un periodo de 10 minutos. Posteriormente, se registró la corriente activada por glicina comprobándose un porcentaje de potenciación por etanol de un  $35\pm 7\%$ , lo que representa una diferencia no significativa con respecto a la condición control ( $48\pm 3\%$ , Figura 16b).



**Figura 16. Efecto de M554 y M890 aplicado extracelularmente en células HEK293.**

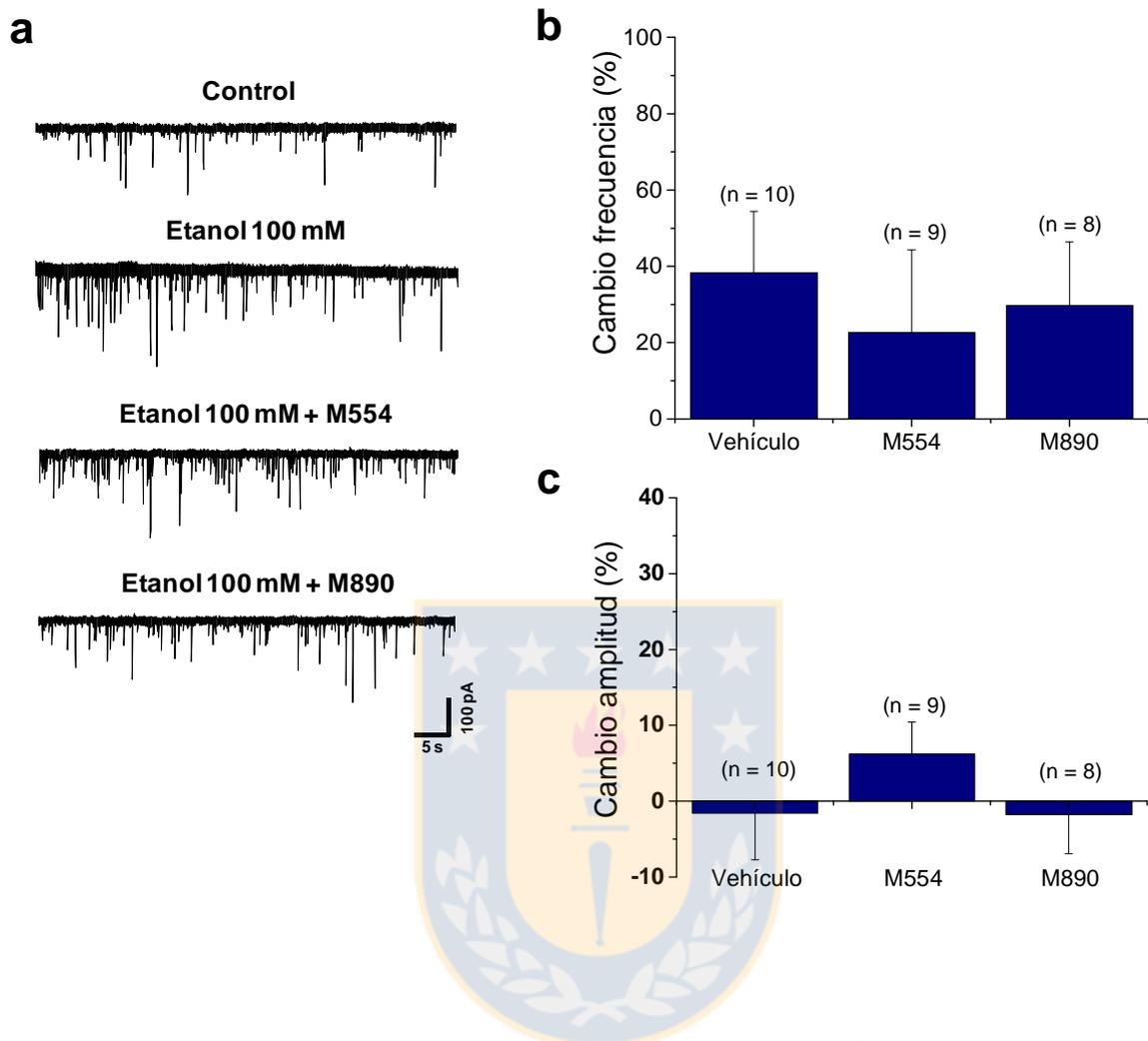
Corrientes evocadas por glicina fueron registradas en células HEK293 que sobreexpresaban GlyRs en ausencia y presencia de etanol, luego de la aplicación extracelular de las moléculas M554 y M890. **(a)** Cuantificación del porcentaje de potenciación por etanol del GlyR después de la incubación por 45 minutos con vehículo (0,4% DMSO), con M554 o M890 (200  $\mu$ M). **(b)** Cuantificación del porcentaje de potenciación por etanol del GlyR luego de perfundir por 10 minutos con vehículo (0,4% DMSO) o con M554 (200  $\mu$ M). Los valores representan el promedio  $\pm$  error (\* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### **3.2.1.3 Efecto de M554 y M890 sobre los parámetros de corrientes glicinérgicas modificadas por etanol**

Luego de determinar los efectos inhibitorios de M554 y M890 en la línea celular HEK293, ya sea aplicando el compuesto intracelularmente o extracelularmente, fue importante estudiar su efecto en cultivo de neuronas que expresan naturalmente los receptores estudiados. Para ello, se utilizaron cultivos de neuronas espinales de ratón C57BL/6J de 13 a 17 DIV, las cuales expresan GlyR $\alpha_1$  (Aguayo et al. 2004). Las neuronas espinales inician el proceso de sinaptogénesis luego de 5 DIV, sin embargo a partir de los 12 DIV es posible encontrar sinapsis maduras (van Zundert et al. 2004). Además, previamente se ha descrito que GlyR $\alpha_1$ , y no GlyR $\alpha_2$ , contiene los determinantes moleculares necesarios para la potenciación por etanol (Yevenes et al. 2010). En este modelo neuronal se evaluaron distintos parámetros de las corrientes inhibitorias postsinápticas glicinérgicas en presencia de M554 y M890. Del mismo modo, se aplicó el compuesto intracelularmente a través de la pipeta de registro y se esperó por un periodo de 15 minutos hasta la completa difusión de la molécula al espacio intracelular. Para llevar a cabo esto, se aislaron farmacológicamente las corrientes de interés mediante la aplicación de CNQX (4  $\mu$ M) y bicuculina (4  $\mu$ M) a la solución externa para bloquear los receptores AMPA y GABA $_A$ , respectivamente.

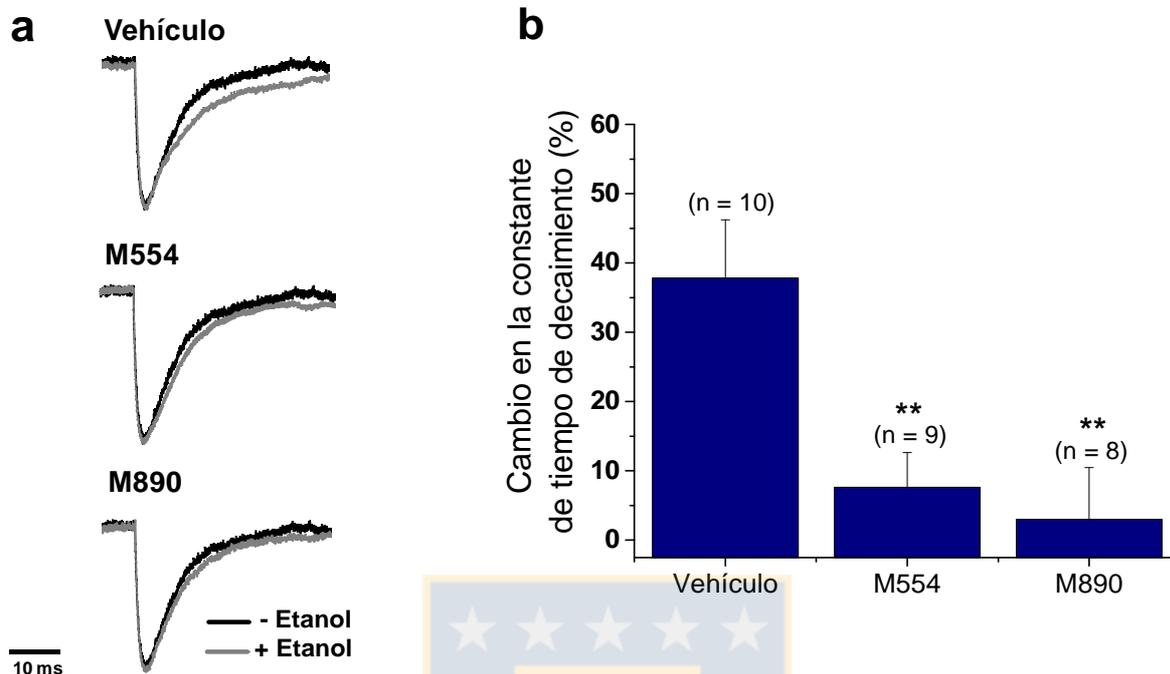
En la figura 17a se muestran trazos representativos de mIPSC glicinérgicas en ausencia y presencia de 100 mM de etanol luego de la aplicación intracelular de 200  $\mu$ M de M554 o M890. El análisis de los resultados obtenidos demuestra que la aplicación de etanol es capaz de aumentar la frecuencia y la constante de

tiempo de decaimiento en un  $38\pm 16\%$  y un  $38\pm 8\%$ , respectivamente (Figura 17b y 18b), tal como ha sido demostrado en estudios anteriores (Mariqueo et al. 2014). A esta concentración de etanol, no se observó un cambio en la amplitud de las IPSC glicinérgicas ( $-2\pm 6\%$ , Figura 17c). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mariqueo et al. que indican que etanol altera los parámetros frecuencia y constante de tiempo de decaimiento en neuronas espinales en cultivo. Luego de 15 minutos de aplicación de M554 y M890, el aumento en la frecuencia producto de etanol no fue revertido en presencia de ambos compuestos ( $23\pm 22\%$  y  $30\pm 17\%$ , respectivamente). Sin embargo, las moléculas M554 y M890 revertieron significativamente los efectos producidos por etanol en la constante de tiempo de decaimiento, disminuyendo este parámetro a un  $8\pm 5\%$  y  $3\pm 7\%$ , respectivamente (Figura 18b). Para el caso de la amplitud, los resultados muestran que M554 y M890 no modificaron significativamente este parámetro ( $6\pm 4\%$  y  $-2\pm 5\%$ , respectivamente). Estos resultados demuestran que los compuestos estudiados afectan un parámetro postsináptico relacionado con la capacidad de receptor de mantenerse en un estado abierto y que además estos compuestos son capaces de llegar a sitios postsinápticos de la neurona para ejercer su función inhibitoria.



**Figura 17. Efecto de M554 y M890 en mIPSC glicinérgicas de neuronas espinales en cultivo.**

**(a)** Trazos de corrientes glicinérgicas representativas aisladas farmacológicamente (CNQX, gabazina y TTX) desde neuronas espinales de ratón en ausencia o presencia de 100 mM de etanol, luego de 15 minutos de perfusión intracelular con 200  $\mu$ M de M554 o M890. Vehículo corresponde a 0,4% de DMSO **(b)** La gráfica muestra el porcentaje de cambio de la frecuencia de los eventos glicinérgicos en respuesta a etanol luego de 15 minutos de aplicación intracelular de M554 o M890. **(c)** Representación gráfica del porcentaje de cambio de la amplitud de las corrientes glicinérgicas estudiadas. No se observaron diferencias significativas.



**Figura 18. Inhibición de los efectos sinápticos de etanol por las moléculas M554 y M890.**

**(a)** mIPSC glicinérgicas aisladas desde actividad sináptica de neuronas espinales en cultivo registradas en ausencia (trazos negros) y presencia de etanol (100 mM, trazos grises) y M554 o M890 (200  $\mu$ M cada uno, aplicado intracelularmente). **(b)** La gráfica muestra el porcentaje de cambio en presencia y ausencia de etanol de la constante de tiempo de decaimiento. En ausencia de moléculas (vehículo), etanol induce un incremento en la constante de tiempo de decaimiento. Luego de 15 minutos de aplicación intracelular de las moléculas M554 y M890 (200  $\mu$ M), este aumento se redujo significativamente. Los valores representan el promedio  $\pm$  error (\*\* ANOVA,  $p < 0.01$ ).

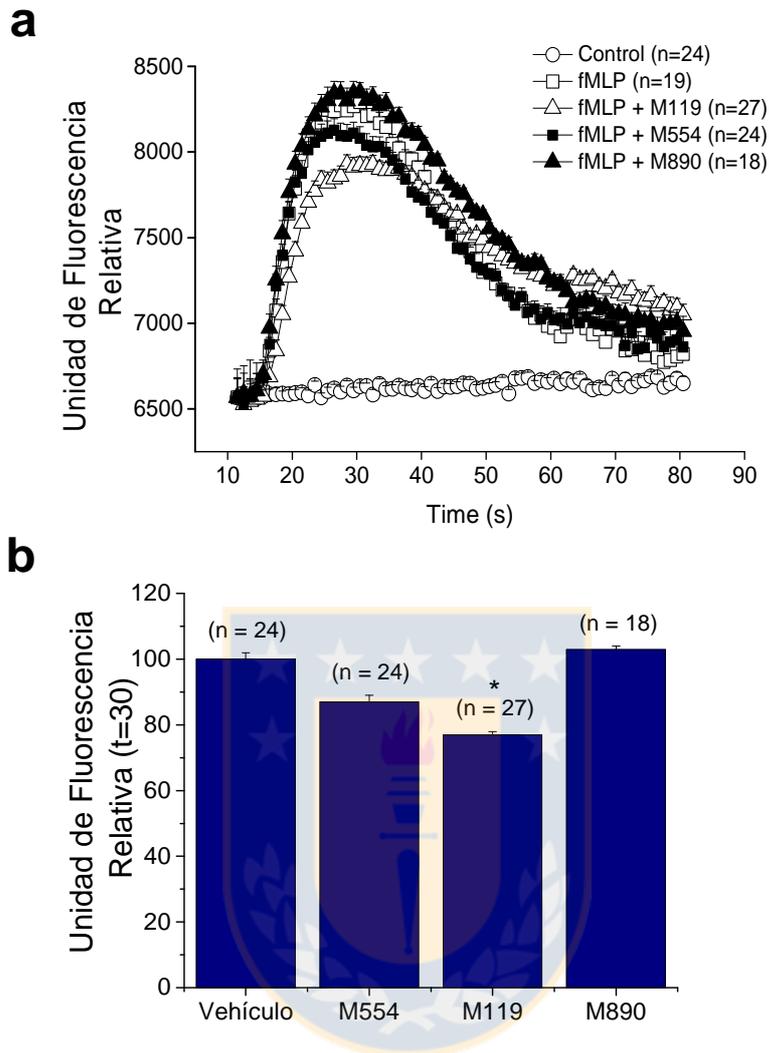
### **3.2.1.4 Moléculas pequeñas interfieren con la vía de señalización GIRK-G $\beta\gamma$ , pero no altera la activación de PLC $\beta$ 2 mediada por G $\beta\gamma$ .**

Ya se mencionó en la sección anterior que el dímero G $\beta\gamma$  controla una gran variedad de efectores, los cuales van desde proteínas de membrana hasta enzimas solubles, todo esto mediante interacciones directas entre G $\beta\gamma$  y el efector (Clapham and Neer 1997). A pesar de la reconocida importancia de estas vías de transducción de señales, hasta ahora existe solo un estudio que se ha enfocado en encontrar moléculas pequeñas que sean capaces de interferir con esta unión, tal como la molécula M119 desarrollada por el grupo de Smrcka (Bonacci et al. 2006). Un factor clave en la búsqueda de nuevas moléculas es la especificidad de éstas en la inhibición de la activación de ciertos efectores por parte de G $\beta\gamma$ . En este trabajo de tesis, analizamos el efecto de M554 y M890 en dos efectores de G $\beta\gamma$ : fosfolipasa C $\beta$  y canales de calcio de tipo GIRK.

- *Moléculas pequeñas no interfieren con la vía de señalización del PLC $\beta$ 2*

Una de las formas de activación de la vía de señalización de PLC $\beta$ 2 es a través del dímero G $\beta\gamma$ . La activación de este efector provoca un aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular promoviendo distintos procesos celulares. El agonista fMLP (Formil-metionil-leucil-fenilalanina), una molécula de señalización, al unirse al receptor acoplado a proteína Gi/o, provoca la disociación del heterotrímero G $\alpha\beta\gamma$ , induciendo que el dímero G $\beta\gamma$  se una a fosfolipasa C, activándola (Lew et al. 1986). Esta enzima posteriormente hidroliza PIP<sub>2</sub>; en DAG e IP<sub>3</sub>, que actúan

como segundos mensajeros. La liberación de IP3 induce la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico provocando la movilización y salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma. Usando este sistema de señalización en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos que expresan el receptor de fMLP, se procedió a ensayar la capacidad de M554 y M890 de inhibir la activación de PLC $\beta$  y por ende la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Usando Fluo-8, una sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$ , fue posible determinar la activación de este efector en respuesta a fMLP. Los resultados indican que 200  $\mu\text{M}$  de las moléculas M554 y M890 no interfieren con la activación de PLC $\beta$ 2, debido a que los niveles fluorescencia normalizada llegaron a un  $87\pm 2\%$  y  $103\pm 1\%$ , respectivamente con respecto al control sin molécula ( $100\pm 2\%$ , Figura 19). La molécula M119 fue probada como control positivo por su capacidad para inhibir la activación mediada por G $\beta\gamma$  de PLC $\beta$ 2, tal como ha sido demostrado en estudios anteriores (Bonacci et al. 2006). Como se esperaba, M119 inhibió significativamente el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a un  $77\pm 1\%$  en el tiempo máximo (Figura 19).

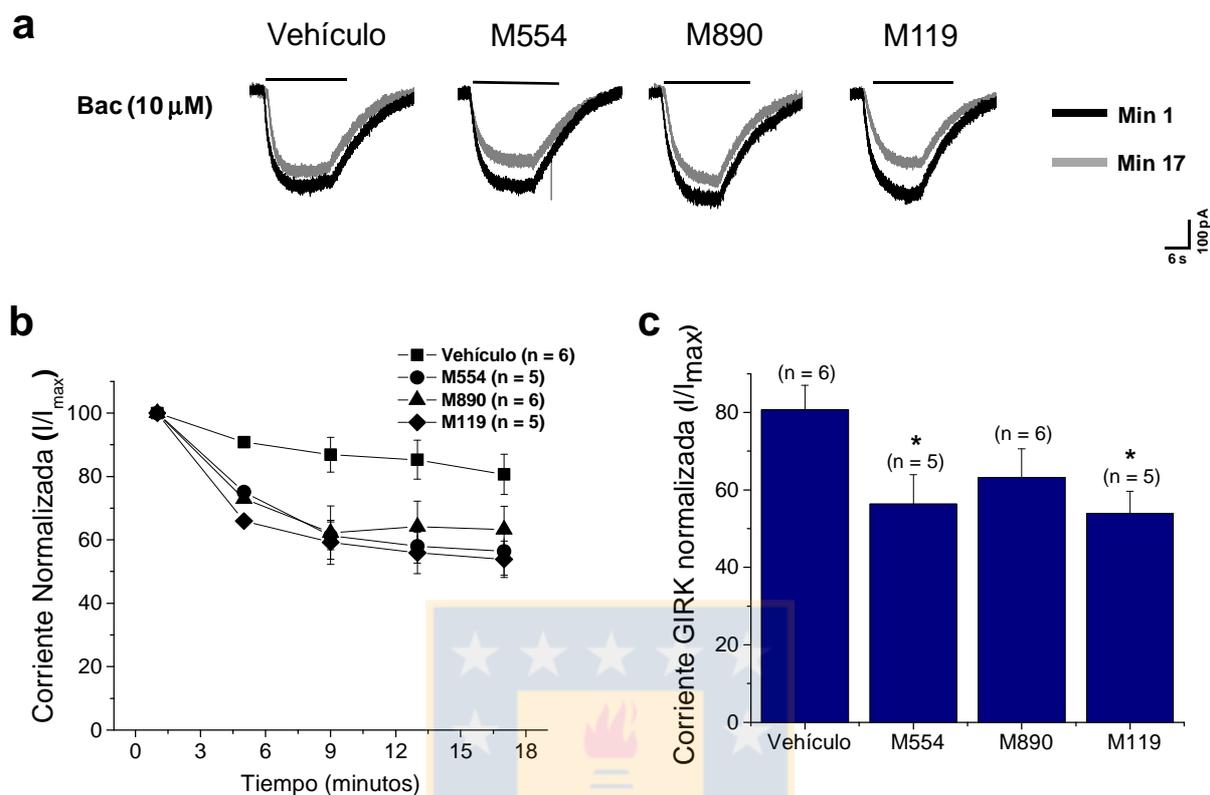


**Figura 19. Activación de PLCβ2 activado por Gβγ**

Células HL60 fueron incubados con las moléculas M554, M890 o M119 en presencia del agonista fMLP (5 μM). Para la medición de Ca<sup>2+</sup> citosólico las células fueron previamente tratadas con la sonda fluorescente Fluo8. La fluorescencia producida por la unión de Ca<sup>2+</sup> a esta sonda fue monitoreada a 485/520 nm durante 80 segundos. **(a)** Representación gráfica de la fluorescencia registrada luego de la incubación por 15 minutos con 200 mM de cada una de las moléculas M554, M890 y M119. **(b)** La gráfica representa los niveles de fluorescencia en el punto máximo correspondiente a 30 segundos para cada condición estudiada. Los valores representan el promedio ± error (\* ANOVA, p < 0,05).

- *Activación de canales de potasio de tipo GIRK*

La activación del receptor GABA<sub>B</sub>, activa a la proteína heterotrimérica Gi, liberando el dímero Gβγ, el cual puede modular la actividad de efectores como los canales de potasio rectificadores activados por proteína G (GIRK). La estimulación de receptores GABA<sub>B</sub> con 10 μM de baclofen, induce una corriente de K<sup>+</sup> que es mediada por el dímero Gβγ (White et al. 1998; Krapivinsky et al. 1998). Este sistema de transducción se ha usado en el presente estudio como un medio para determinar si las moléculas M554, M890 y M119 interfieren con esta vía de señalización. Los resultados fueron expresados como corriente GIRK a los 17 minutos normalizada con respecto a la corriente al tiempo inicial para cada condición ( $I_{t=17}/I_{t=1}$ ) (Figura 20). Se verificó que luego de 17 minutos de difusión intracelular con 200 μM de M890 no se vio afectada significativamente la activación del canal GIRK por baclofen ( $63 \pm 7\%$ ). Sin embargo, utilizando la misma concentración de M554 se observó que esta molécula inhibió significativamente la activación de este canal ( $56 \pm 7\%$ , Figura 20). Curiosamente, M119, también inhibió la activación de canales GIRK ( $54 \pm 6\%$ ). Cabe mencionar que en presencia de vehículo la corriente GIRK disminuyó hasta un valor de  $81 \pm 6\%$ .

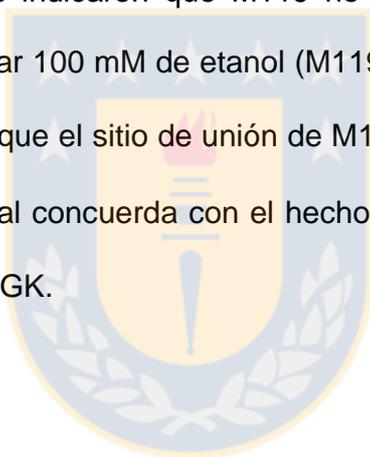


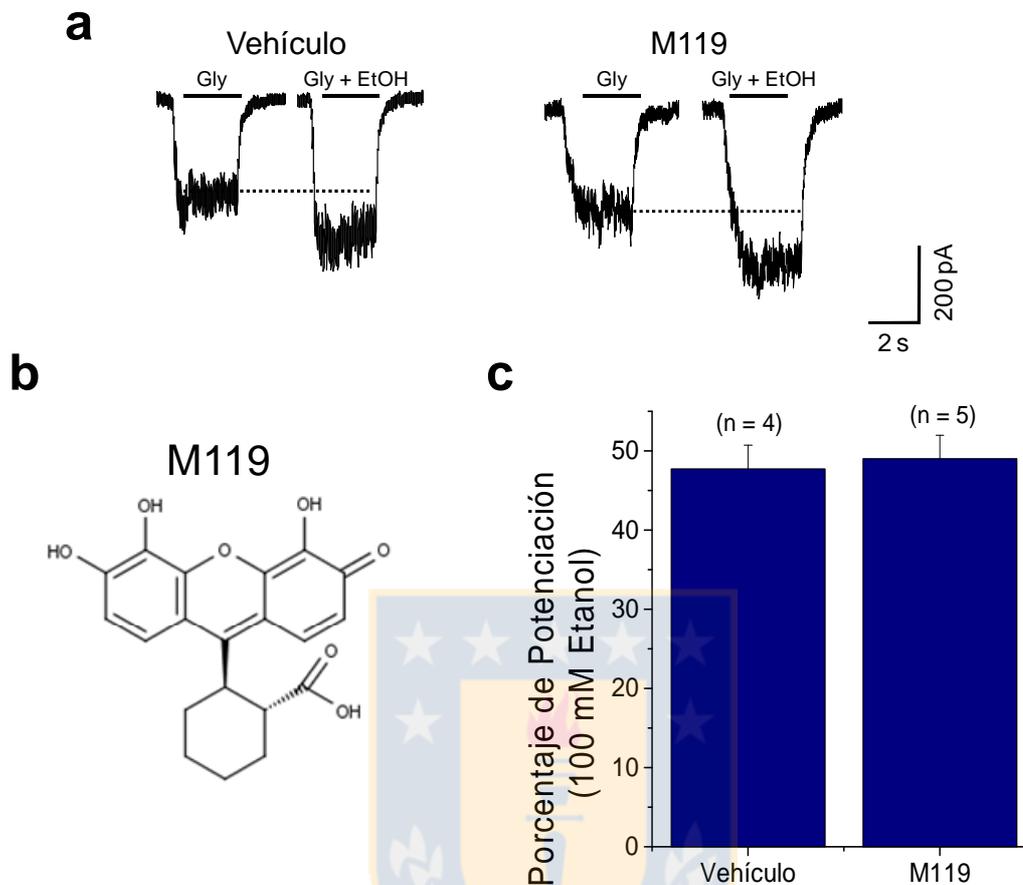
**Figura 20. Moléculas pequeñas inhiben la activación mediada por  $G\beta\gamma$  de canales de tipo GIRK.**

Células HEK293 que coexpresan  $GABA_B$  y GIRK fueron registradas mediante electrofisiología aplicando intracelularmente las moléculas que se indican. Se perfundió con baclofen (10  $\mu$ M) cada cuatro minutos registrándose las corrientes de  $K^+$  generadas por activación del canal. **(a)** Trazos representativos de corrientes de  $K^+$  al minuto 1 y al minuto 17 luego de la activación de canales GIRK por receptores  $GABA_B$  estimulados con baclofen en ausencia y presencia de 200  $\mu$ M de M554, M890 o M119 aplicada intracelularmente. **(b)** Curso temporal de las corrientes de  $K^+$  luego de la activación de canales GIRK en ausencia y presencia de moléculas pequeñas. **(c)** La gráfica representa la cuantificación de la corriente GIRK normalizada al minuto 17 de aplicación de las distintas moléculas. Los valores representan el promedio  $\pm$  error (\* ANOVA, p < 0,05).

### 3.2.1.5 Efecto de M119 en la potenciación del GlyR por etanol

En los resultados previos se estudió el efecto de las moléculas pequeñas M554 y M890 en dos efectores de  $G\beta\gamma$ . En cada uno de ellos se incluyó como control la nueva molécula M119, la cual ha sido previamente identificada por Smrcka y col. debido a que es una molécula que se une a  $G\beta$ , por lo que surge la pregunta de si esta nueva molécula es capaz de interferir con los efectos de etanol en el GlyR. Para ello se procedió a estudiar el efecto de esta molécula en la potenciación de GlyR por etanol usando condiciones similares a las anteriores (Figura 14). Los resultados indicaron que M119 no disminuyó el porcentaje de potenciación del GlyR al usar 100 mM de etanol (M119:  $49\pm 3\%$  vs. control:  $48\pm 3\%$ , Figura 21). Esto nos indica que el sitio de unión de M119 en  $G\beta$  no coincide con el sitio de unión a GlyR, lo cual concuerda con el hecho de que M119 se une a  $G\beta\gamma$  en el sitio para el péptido SIGK.





**Figura 21. Efecto de M119 en la potenciación del GlyR por etanol.**

Corrientes evocadas por glicina fueron registradas en células HEK293 que sobreexpresaban GlyRs en ausencia y presencia de etanol, luego de 15 minutos de difusión intracelular con M119. **(a)** Trazos de corrientes evocadas por aplicación de glicina 15  $\mu$ M en ausencia y presencia de 100 mM etanol luego de 15 minutos de difusión intracelular con M119 a una concentración de 200  $\mu$ M. **(b)** Estructura bidimensional de la molécula M119. **(c)** La gráfica representa el porcentaje de potenciación por etanol de la corriente evocada por glicina después de 15 minutos de difusión intracelular de M119. Los valores representan el promedio  $\pm$  error. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas.

### 3.2.2 Modificación de grupos químicos en M554 y M890 interfiere con su efecto inhibitorio

Con el objetivo de analizar el efecto de algunos grupos químicos de las moléculas M554 y M890 en su capacidad inhibitoria, se estudiaron distintos análogos e isómeros de estas moléculas. Dichas moléculas nuevas presentan distintas sustituciones en los grupos químicos, que mediante los análisis *in silico*, se determinaron como regiones importantes para la interacción entre M554 y M890 con grupos aminoacídicos de G $\beta$  (Asp186, 228 y 246). Producto de esta información, se diseñaron de forma racional las moléculas M554-1, M554-2, M554-4, M890-6 y M890-7 (Figura 22), las cuales fueron sintetizadas y donadas por el Dr. Chunyang Jin (RTI, USA).

Las moléculas M554-1 y M554-2, representadas en la figura 22, incluyen los grupos químicos indol importante para la interacción con el Asp186. Los grupos amidas (M554-2) o el grupo urea (M554-1) en la región central son relevantes para promover la interacción con los residuos Asp228, Asp246 y Asn230. De forma adicional se incluyeron los grupos metoxifenilo (M554-2) y dimetoxifenil (M554-1) para promover la interacción con el residuo de Tyr59. Para el caso de la molécula M554-4, no se reemplazó ningún grupo químico, sin embargo, se adicionó un carbono a la cadena principal, alejando el grupo indol del Asp186 presente en G $\beta$ .

Con el objetivo de generar una modificación en M890 se diseñaron las moléculas M890-6 y M890-7, representadas en Figura 22. Para ello se reemplazó el grupo metoxi unido al grupo fenilo por el grupo hidroxietil (M890-6) o por el

grupo acetil (M890-7). Ambos grupos podrían formar un puente de hidrogeno con el Asp186, de esta forma la actividad de dicha molécula podría aumentar.

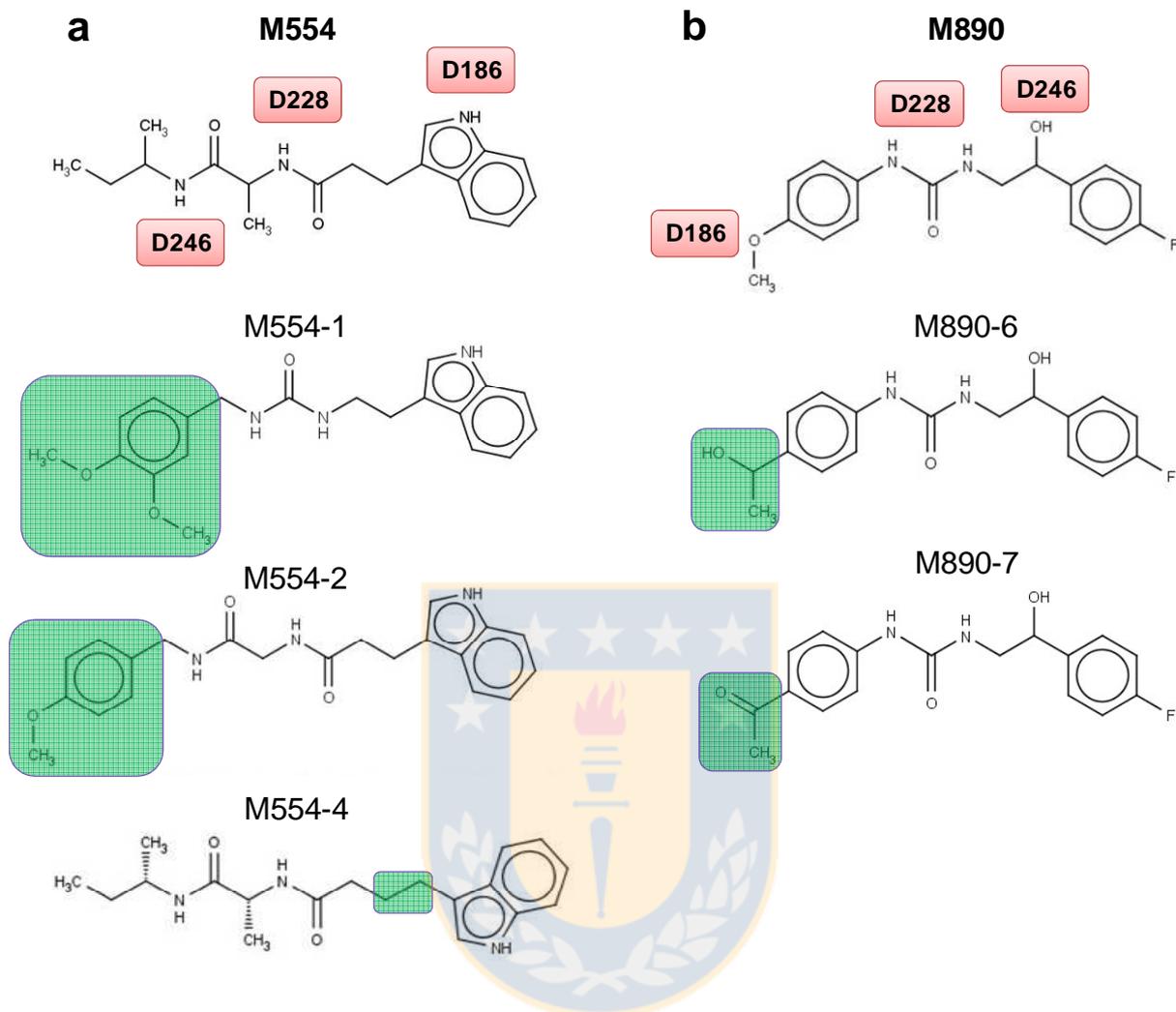
En la Tabla 2 se detalla el nombre IUPAC para cada una de las nuevas moléculas estudiadas, destacándose el nombre de los grupos químicos que se añadieron en el diseño racional.

**Tabla 2. Nombres IUPAC de análogos de M554 y M890**

<b>Molécula</b>	<b>Nombre</b>
M554-1	1-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-3-[2-(1H-indol-3-il)etil]urea
M554-2	3-(1H-indol-3-il)-N-({[(4-metoxifenil)metil] carbamoil}metil)propanamida
M554-4	N-[(1R)-1-{{(2S)-butan-2-yl}carbamoil}etil]-4-(1H-indol-3-il)butanamida
M890-6	1-[2-(4-fluorofenil)-2-hidroxietil]-3-[4-(1-hidroxietil)fenil]urea
M890-7	3-(4-acetilfenil)-1-[2-(4-fluorofenil)-2-hidroxietil]urea

### 3.2.2.1 Análogos de M554 disminuyen la potenciación del GlyR por etanol

Con el objetivo de testear el efecto de estas nuevas moléculas diseñadas en forma racional en la potenciación del GlyR por etanol, se realizaron ensayos electrofisiológicos en células HEK293 con cada una de las cinco moléculas descritas anteriormente. El compuesto fue aplicado intracelularmente a través de la pipeta de registro a una concentración de 200  $\mu$ M y se esperó 15 minutos para permitir la difusión en el citoplasma. En presencia de los análogos M554-1 y M554-2 hubo una inhibición de la potenciación por etanol del GlyR alcanzando valores de  $19\pm 1\%$  y  $22\pm 2\%$  respectivamente. Por otro lado, cuando se incluyó la molécula M554-4 a la solución intracelular, el porcentaje de potenciación no cambió ( $53\pm 4\%$ , Figura 23).

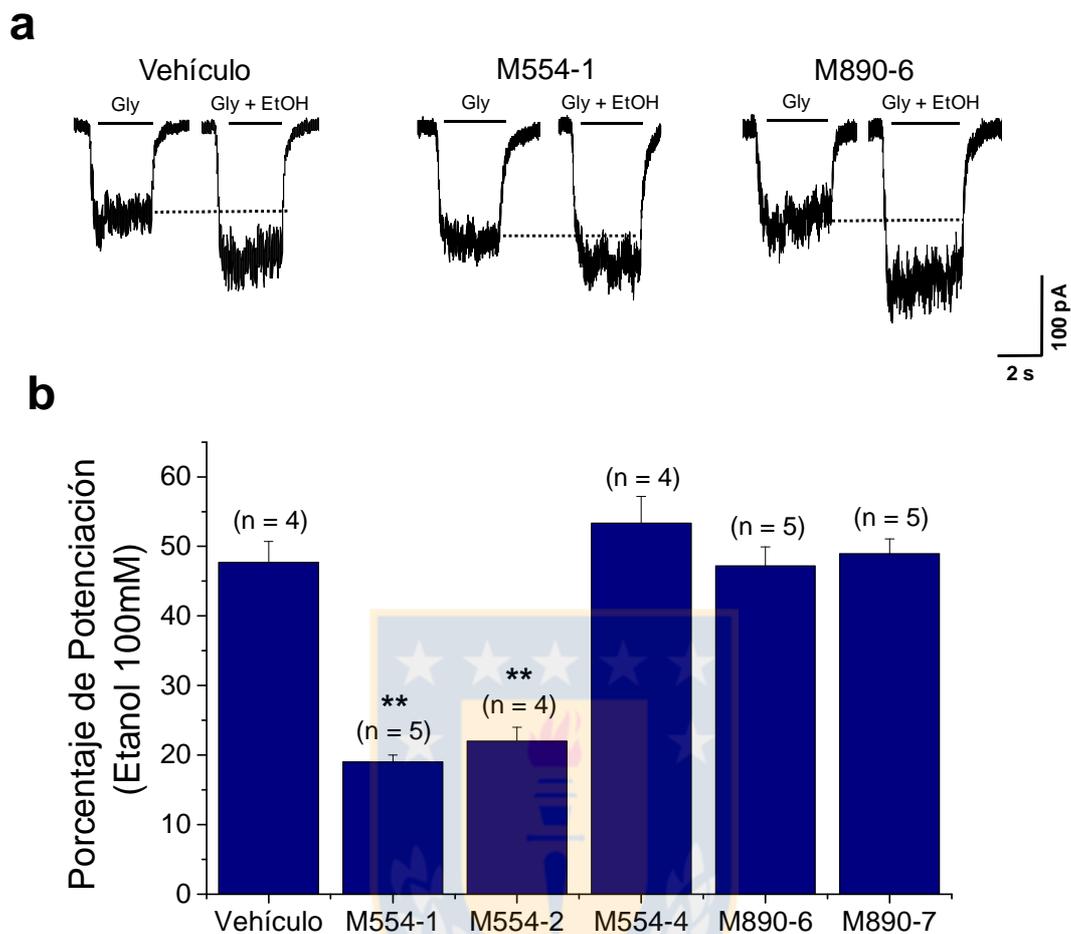


**Figura 22. Representación en dos dimensiones de análogos de M554 y M890 (ChemAxon, 2013).**

Las nuevas moléculas fueron sintetizadas mediante un diseño racional, donde los grupos químicos destacados en verde representan los grupos modificados, los cuales permitirían una mayor interacción con  $G\beta\gamma$ . Los recuadros en rojo representan los aminoácidos en  $G\beta$  con los que interaccionan las moléculas M554 y M890.

Cuando se estudió los análogos M890-6 y M890-7 se encontró que estas moléculas no tuvieron efecto inhibitorio en la potenciación por etanol del GlyR, llegando a valores de  $47\pm 3\%$  y  $49\pm 2\%$ , respectivamente. Esto indica que los grupos químicos incorporados no favorecen la interacción con G $\beta$ , y por lo tanto, los grupos reemplazados en M890 serían importantes para que esta molécula interaccione con los ácidos aspárticos en G $\beta$ .

A partir de los resultados obtenidos con los análogos de M554 y M890, es posible inferir que las modificaciones que generaron las moléculas M554-1 y M554-2, favorecieron la interacción con G $\beta$ , permitiendo de esta forma una mayor actividad inhibitoria en comparación con el resto de las moléculas estudiadas. Por el contrario, las moléculas M890-6, M890-7 y M554-4 no tuvieron efecto sobre la potenciación de GlyR. Las sustituciones en el grupo metoxi en M890 afectaron negativamente en la inhibición de la potenciación de GlyR. Por otro lado, la adición de un carbono a la cadena principal de M554-4, afectó negativamente el efecto inhibitorio de esta molécula.

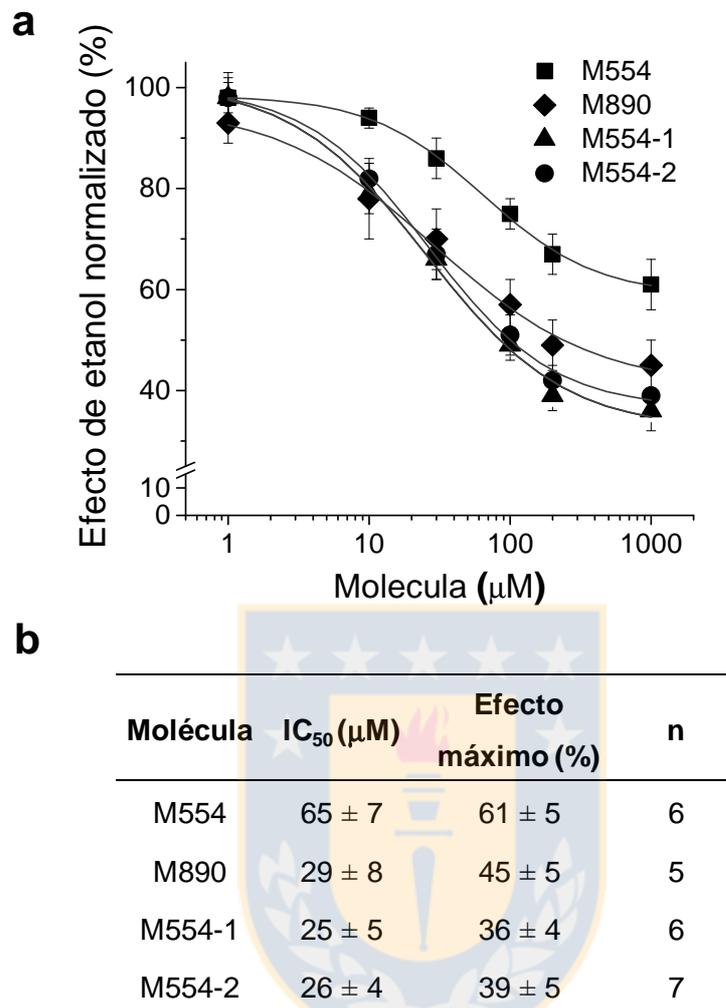


**Figura 23. Análogos de M554 inhiben la potenciación del GlyR por etanol.**

Corrientes evocadas por glicina fueron registradas en células HEK293 que sobreexpresaban GlyRs en ausencia y presencia de etanol, luego de 15 minutos de difusión intracelular con las moléculas señaladas. **(a)** Trazos de corrientes evocadas por aplicación de glicina 15  $\mu$ M en ausencia y presencia de 100 mM etanol luego de 15 minutos de difusión intracelular con los análogos M554-1 y M890-6 a una concentración de 200  $\mu$ M. **(b)** La gráfica resume el porcentaje de potenciación por etanol de la corriente evocada por glicina después de 15 minutos de aplicación intracelular de M554-1, M554-2, M554-4, M890-6 y M890-7. Los valores representan el promedio  $\pm$  error. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (\* ANOVA,  $p < 0,05$ ; \*\* ANOVA,  $p < 0,01$ ).

Como una manera de determinar la capacidad inhibitoria de las moléculas que han presentado mayor actividad inhibitoria hasta ahora, se realizaron curvas de inhibición para determinar los valores de  $IC_{50}$  (concentración necesaria para inhibir el 50% de la respuesta) de M554, M890, M554-1 y M554-2. Para realizar esto, se utilizó las concentraciones 1, 10, 30, 100, 200 y 1000  $\mu$ M para cada uno de los compuestos mencionados, usando una concentración de 15  $\mu$ M de glicina y 100 mM de etanol, luego de 15 minutos de difusión intracelular con cada una de las moléculas. La figura 24a muestra la curva de inhibición obtenida con las moléculas cuyo porcentaje de potenciación por etanol fue menor a un 30%, en donde los valores de  $IC_{50}$  y efecto de etanol máximo normalizado se representan en la tabla de la figura 24b. Los valores de  $IC_{50}$  se encuentran dentro del rango micromolar, lo cual es un buen indicador para moléculas pequeñas con características inhibitorias.

A pesar de que las moléculas M554-1 y M554-2 son las de mayor capacidad inhibitoria, la cual se refleja en los valores de  $IC_{50}$ , no fue posible continuar trabajando con ellas en los ensayos posteriores, debido a problemas de solubilidad. Por esta razón, las moléculas M554 y M890 son los compuestos que se estudiarán en ensayos de comportamiento animal.



**Figura 24. Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de moléculas pequeñas en la potenciación por etanol de GlyRs.**

Corrientes evocadas por glicina fueron registradas en células HEK293 que sobreexpresaban GlyRs en ausencia y presencia de etanol, luego de 15 minutos de difusión intracelular con las moléculas señaladas a distintas concentraciones.

**(a)** Curvas de inhibición de la potenciación del GlyR por etanol en presencia de las moléculas M554, M890, M554-1 y M554-2, aplicados intracelularmente a concentraciones de 1, 10, 30, 100, 200 y 1000 μM. **(b)** Se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> y efecto de etanol máximo normalizado (Efecto máximo) desde las curvas concentración-respuesta para cada molécula estudiada. Los valores representan el promedio ± error.

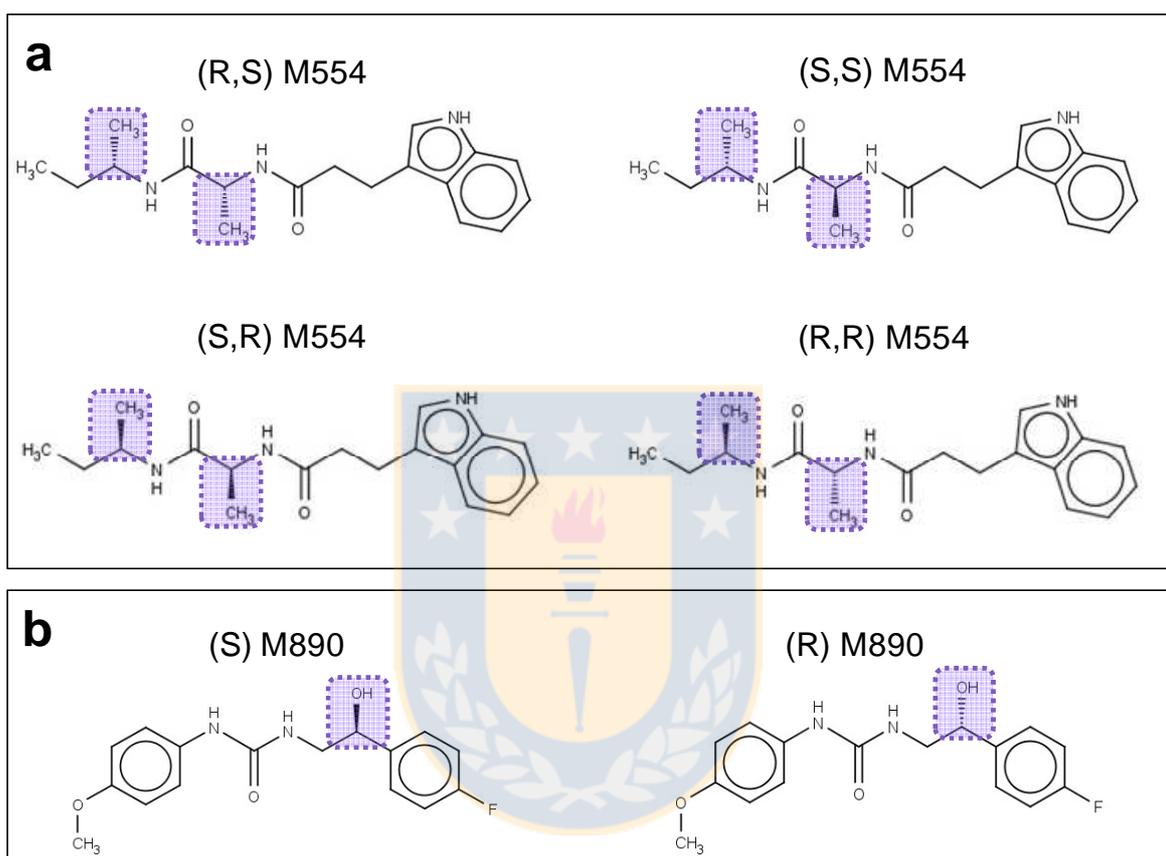
### 3.2.2.2 Enantiómeros activos de M554 y M890

Debido a que hasta ahora se han ensayado sólo las formas racémicas de las moléculas M554 y M890, es necesario conocer el enantiómero activo para cada compuesto. Esto es importante en la búsqueda de nuevas moléculas guías, ya que se ha determinado que ciertos fármacos son estereoselectivos, es decir, la unión del fármaco a su receptor es favorable sólo para una de las formas enantioméricas (Andersson and Weidolf 2008). Para lograr eso, se realizaron ensayos electrofisiológicos con los enantiómeros de estas moléculas las cuales se representan en la Figura 25. La molécula M554 presenta dos carbonos quirales en su estructura, generando cuatro enantiómeros distintos: (R,S)-M554, (S,S)-M554, (R,R)-M554 y (S,R)-M554 (Figura 25a), mientras que M890 presenta un carbono quiral, por lo que existen dos enantiómeros para este compuesto: (R)-M890 y (S)-M890 (Figura 25b).

Al evaluar la capacidad de estos compuestos de inhibir la potenciación del GlyR por etanol, el enantiómero (R)-M890 resultó ser activo, ya que el porcentaje de potenciación llegó a un  $33\pm 3\%$ , a diferencia de (S)-M890, con un  $49\pm 5\%$  (Figura 26). Para el caso de M554, las formas (R,R)-M554 y (S,R)-M554 inhibieron la potenciación alcanzando valores de  $29\pm 2\%$  y  $33\pm 5\%$ , respectivamente. Por el contrario, las formas (R,S)-M554 y (S,S)-M554 demostraron ser inactivas, ya que etanol potenció al GlyR en un  $52\pm 4\%$  y  $53\pm 4\%$ , respectivamente (Figura 26).

Estos resultados nos indican que la capacidad inhibitoria de las moléculas pequeñas está determinada por la específica orientación de sus grupos químicos

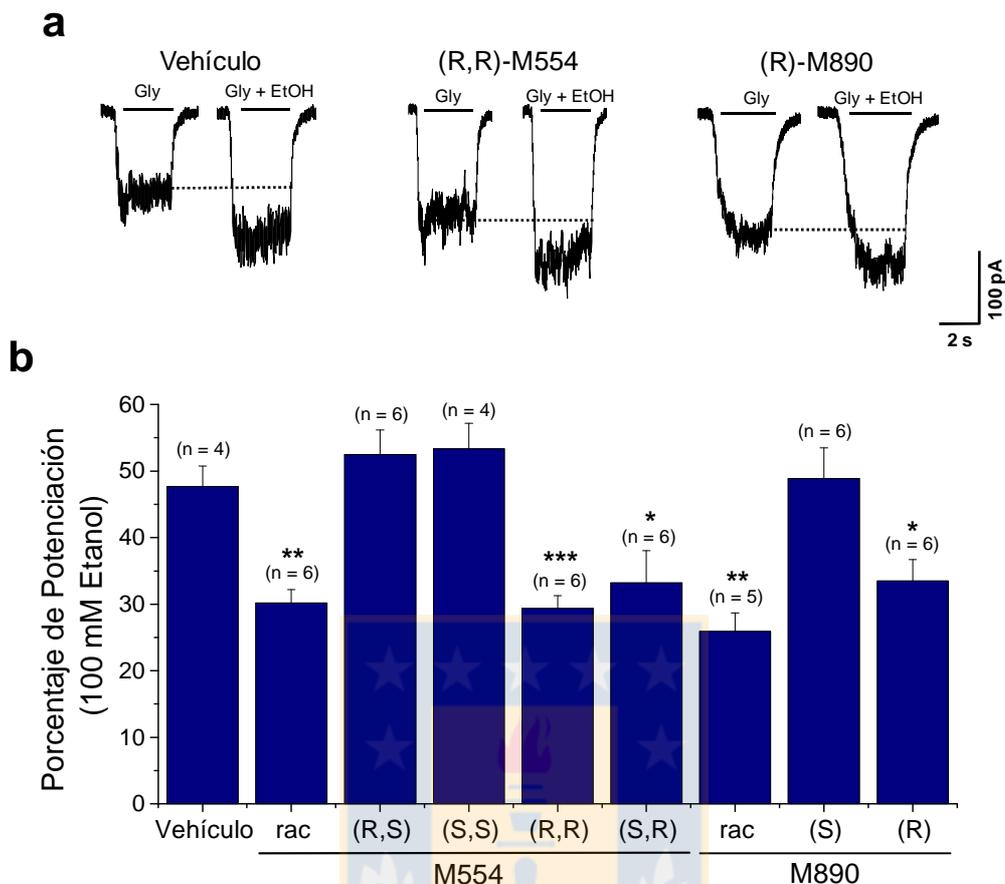
en  $G\beta\gamma$ , ya que el simple cambio en un carbono quiral significó la pérdida de la actividad de un compuesto.



**Figura 25. Representación en dos dimensiones de los enantiómeros de M554 y M890.**

Se destaca en los recuadros color púrpura los carbonos quirales de cada molécula.

**(a)** Estructura de los isómeros (R,S)-M554, (S,S)-M554, (S,R)-M554 y (R,R)-M554. **(b)** Estructura de los isómeros (R)-M890 y (S)-M890.



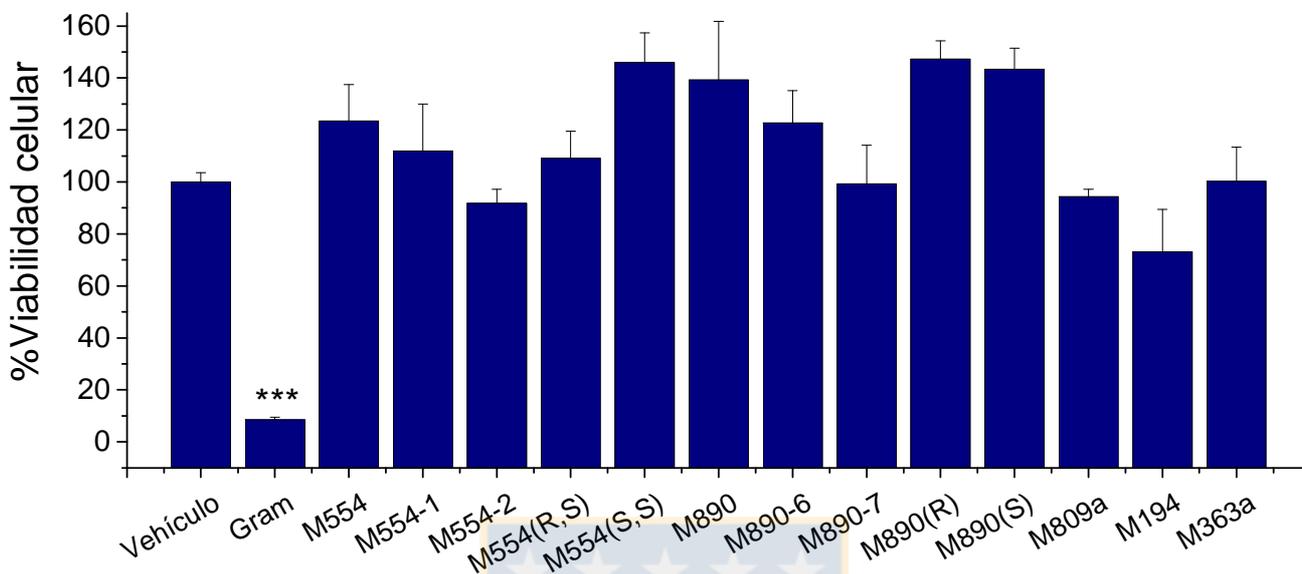
**Figura 26. Efecto de diferentes enantiómeros de M554 y M890 en la potenciación del GlyR por etanol.**

Corrientes evocadas por glicina fueron registradas en células HEK293 que sobreexpresaban GlyRs en ausencia y presencia de etanol, luego de 15 minutos de difusión intracelular con las moléculas señaladas. **(a)** Trazos de corrientes evocadas por aplicación de glicina 15  $\mu$ M en ausencia y presencia de 100 mM etanol luego de 15 minutos de difusión intracelular con los isómeros (R,R)-M554 y (R)-M890 a una concentración de 200  $\mu$ M. **(b)** La gráfica resume el porcentaje de potenciación por etanol de la corriente evocada por glicina después de 15 minutos de aplicación intracelular de (R,S)-M554, (S,S)-M554, (R,R)-M554, (S,R)-M554, (R)-M890 y (S)-M890. Los valores representan el promedio  $\pm$  error. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (\* ANOVA,  $p < 0.05$ ; \*\* ANOVA,  $p < 0.01$ , \*\*\* ANOVA,  $p < 0.001$ ).

### **3.2.2.3 Viabilidad celular no es afectada en presencia de las distintas moléculas estudiadas**

Un aspecto importante a evaluar en la búsqueda de moléculas con potencial farmacológico, es determinar los efectos que éstos tienen en el normal funcionamiento celular. Para ello es necesario conocer ciertos parámetros como toxicidad celular. Para poder evaluar toxicidad celular, se realizó un ensayo de viabilidad celular, el cual mide el efecto tóxico de un compuesto utilizando el poder reductor natural de células vivas para convertir resazurina, un compuesto azul permeable no fluorescente, a resorufina, un compuesto rojo altamente fluorescente, mediante la utilización de Alamar-Blue (Invitrogen). Luego de la incubación con M554, M554-1, M554-2, (R,S)-M554, (S,S)-M554, M890, M890-6, M890-7, (R)-M890, (S)-M890, M809a, M194 y M363a a una concentración de 200  $\mu$ M durante 24 horas, se agregó Alamar Blue y se midieron los niveles de fluorescencia, los cuales fueron normalizados con respecto al vehículo y graficados (Figura 27). Los resultados correspondientes a la incubación con las distintas moléculas, indica que éstas no generan un efecto citotóxico que afecte el funcionamiento normal de la células. Como control positivo de muerte se utilizó gramicidina 100  $\mu$ M.

A pesar de los resultados obtenidos para determinar toxicidad celular, es importante destacar que existe una serie de consideraciones con respecto a los efectos adversos que puedan provocar nuevos compuestos con potencial farmacológico, los cuales se escapan del objetivo de este trabajo.



**Figura 27. Moléculas pequeñas no afectan la viabilidad celular.**

La gráfica muestra el porcentaje de viabilidad de las distintas moléculas estudiadas en este trabajo con respecto al control con vehículo en tratamientos de 24 horas en células HEK293 a una concentración de 200  $\mu$ M. Se ensayaron al menos 3 pocillos por condición. Los valores representan el promedio  $\pm$  error (\* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### **3.2.3 Molécula M554 revierte los efectos depresores de altas concentraciones de etanol *in vivo*.**

Diversos estudios han asociado a los GlyRs con algunos de los efectos agudos que produce el alcohol en comportamiento animal (Blednov et al. 2012, Blednov et al. 2015, Williams et al. 1995). Considerando los resultados obtenidos hasta ahora en modelos *in vitro*, donde una molécula pequeña es capaz de interferir con la unión proteína-proteína e inhibir los efectos de etanol sin afectar la actividad basal del receptor, surge la interrogante de si estas moléculas son capaces de revertir *in vivo* alguno de los efectos del alcohol en los cuales los GlyR estén implicados. Ya se ha determinado en estudios anteriores que los GlyRs están relacionados con la pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR), en donde la subunidad  $\alpha_1$  del receptor sería el responsable de estos efectos (Williams et al. 1995; Aguayo et al. 2014). Por otra parte, un estudio reciente ha relacionado a las subunidades  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  con el consumo y la preferencia hacia el alcohol (Blednov et al. 2015). De acuerdo a esto, administración intracerebroventricular de glicina o su precursor serina aumenta el LORR inducido por etanol en ratones (Williams et al. 1995), y que estos efectos fueron bloqueados por estriquina (Ye, Sokol, and Bhavsar 2009). Adicionalmente ratones knockin (KI) con mutaciones (Q266I, M287L o D80A) en la subunidad  $\alpha_1$  demostraron cambios en la incoordinación motora inducida por etanol y en el LORR (Blednov et al. 2012; McCracken et al. 2013). De forma interesante, en nuestro laboratorio, se ha demostrado que un ratón KI con una mutación que reduce la sensibilidad del GlyR a etanol redujo la duración del LORR inducido por alcohol (Aguayo et al. 2014).

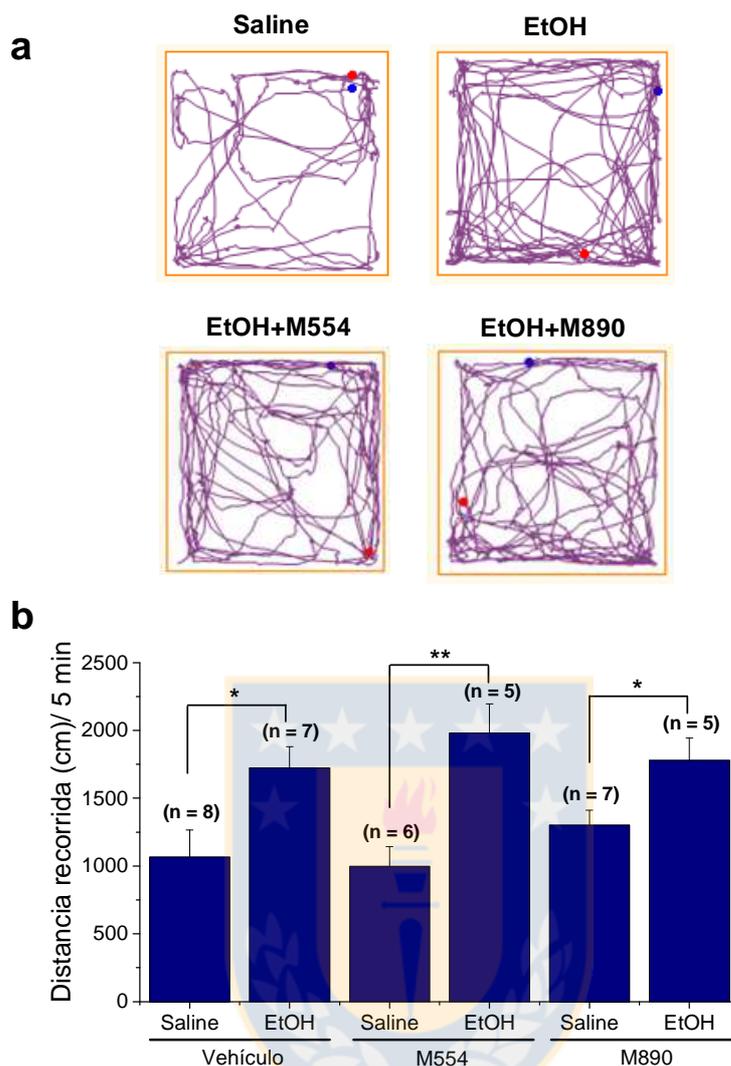
Basado en esta evidencia, se propuso como objetivo ensayar los efectos inhibitorios de las moléculas M554 y M890 usando distintas dosis de etanol en modelos animales en distintos ensayos de comportamiento.

### **3.2.3.1 M554 y M890 no revierten los efectos que etanol produce en actividad motora.**

Con el objetivo de analizar el efecto de moléculas pequeñas a bajas concentraciones de alcohol, se llevó a cabo un ensayo que analiza la actividad exploratoria y locomotora en ratones C57BL/6J. Para analizar esto, se examinó la distancia total recorrida en un periodo de 5 minutos usando el ensayo de “open field”. En la figura 28a se representan algunos ejemplos de los recorridos que realizan los ratones durante los 5 minutos de duración de la prueba. Se muestran ejemplos para las condiciones: salino, etanol, etanol más M554 y etanol más M890. Se utilizó una concentración de 1,0 g/kg de etanol y 100 mg/kg de cada una de las moléculas estudiadas en inyección intraperitoneal. Luego de recibir una inyección de etanol, los ratones mostraron un incremento en la actividad locomotora desde  $1065 \pm 201$  cm para ratones inyectados con salino a un  $1723 \pm 157$  cm para ratones inyectado con alcohol (Figura 28b). Este incremento en la actividad exploratoria no fue revertido en presencia de M554 o M890, ya que para estas moléculas la distancia recorrida en un periodo de 5 minutos fue de  $1980 \pm 215$  cm y  $1779 \pm 166$  cm, respectivamente (Figura 28b). Al analizar lo que ocurre con los efectos de los compuestos *per se* en la actividad exploratoria, los resultados nos indican que

estas moléculas no incrementan la distancia recorrida con respecto a la condición salina ( $997 \pm 146$  cm y  $1301 \pm 111$  cm, respectivamente).





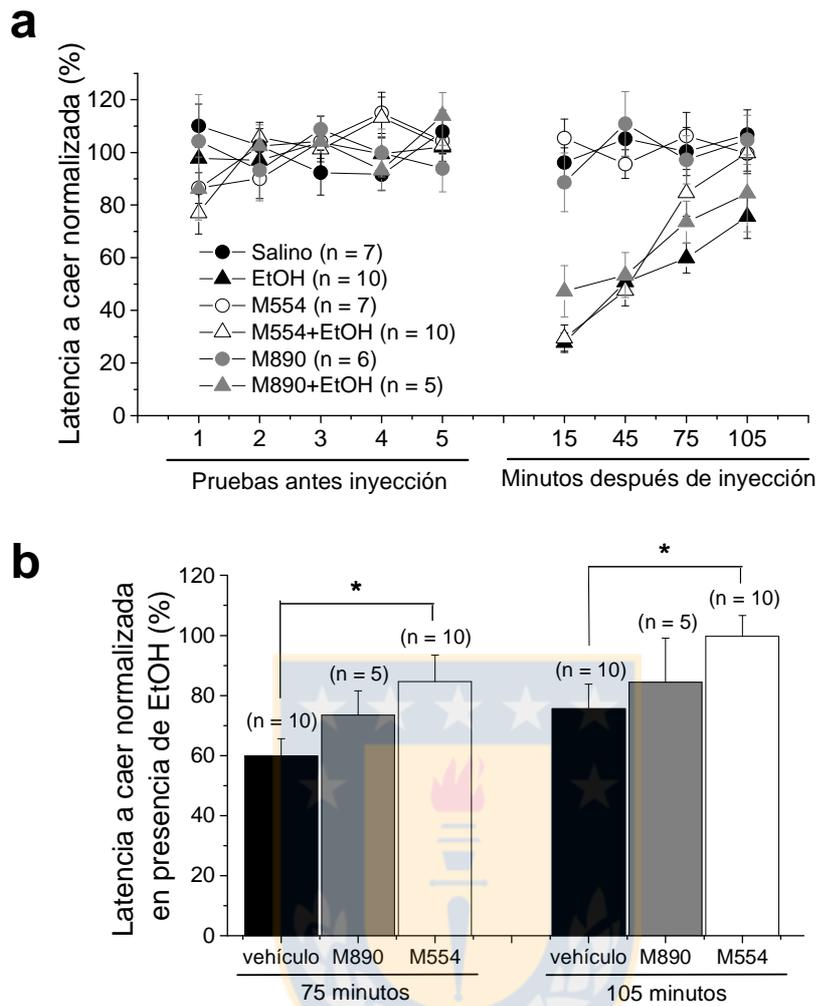
**Figura 28. Efecto de las moléculas M554 y M890 en ensayos de open field en presencia de etanol.**

Ratones C57BL/6J fueron sometidos a ensayos de open field luego de 10 minutos de una inyección intraperitoneal de salino o etanol (1,0 g/kg), en presencia o ausencia de M554 o M890 (100 mg/kg). Para mejorar la solubilidad, las moléculas M554 y M890 fueron incluidas en HP- $\beta$ -CD. **(a)** Trazos esquemáticos del recorrido realizado durante 5 minutos por los ratones luego de la inyección correspondiente. **(b)** La gráfica muestra la distancia total recorrida durante un periodo de 5 minutos. La distancia total recorrida reveló que etanol aumenta la actividad motora de los ratones, el cual no fue revertido en presencia de moléculas pequeñas. Los valores representan el promedio  $\pm$  SE. (two-way ANOVA, análisis post-hoc Bonferroni; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ).

### **3.2.3.2 La recuperación de la coordinación motora en ensayos de rotarod es más rápida en presencia de M554**

Para ensayar los efectos de concentraciones más altas de alcohol, se realizó un ensayo de coordinación motora en presencia y ausencia de M554 o M890 (100 mg/kg) mediante el uso de rotarod acelerado. Para el análisis de estos resultados, se normalizó la latencia a caer con respecto a la condición basal correspondiente al promedio de la latencia a caer durante el entrenamiento para cada animal. La administración aguda de 2,0 g/kg de etanol produjo una incoordinación motora de acuerdo a lo descrito previamente (Blednov et al. 2012), con una latencia a caer reducida a un valor de  $29 \pm 5\%$  con respecto al entrenamiento (Figura 29a, triángulo negro). Luego de la inyección, se realizaron cuatro pruebas cada 30 minutos para registrar la recuperación de la incoordinación motora. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control (etanol) y el grupo M890 (etanol más M890) en la recuperación de la incoordinación motora normalizada (minuto 75:  $74 \pm 8\%$  grupo M890 vs  $60 \pm 6\%$  grupo control; minuto 105:  $85 \pm 15\%$  grupo M890 vs  $75 \pm 8\%$  grupo etanol; Figura 29b). Sin embargo, ratones inyectados con M554 más etanol se recuperaron más rápido de la incoordinación motora provocada por etanol llegando a un  $85 \pm 8\%$  ( $60 \pm 6\%$  para el control) al minuto 75, y a un  $100 \pm 8\%$  ( $75 \pm 8\%$  para el control) al minuto 105 luego de la inyección (Figura 29b).

Estos resultados nos indican que M554 es capaz de acelerar la recuperación de la incoordinación motora producida por etanol en el ensayo de rotarod acelerado, cuyo efecto se refleja 75 minutos luego de las inyecciones.

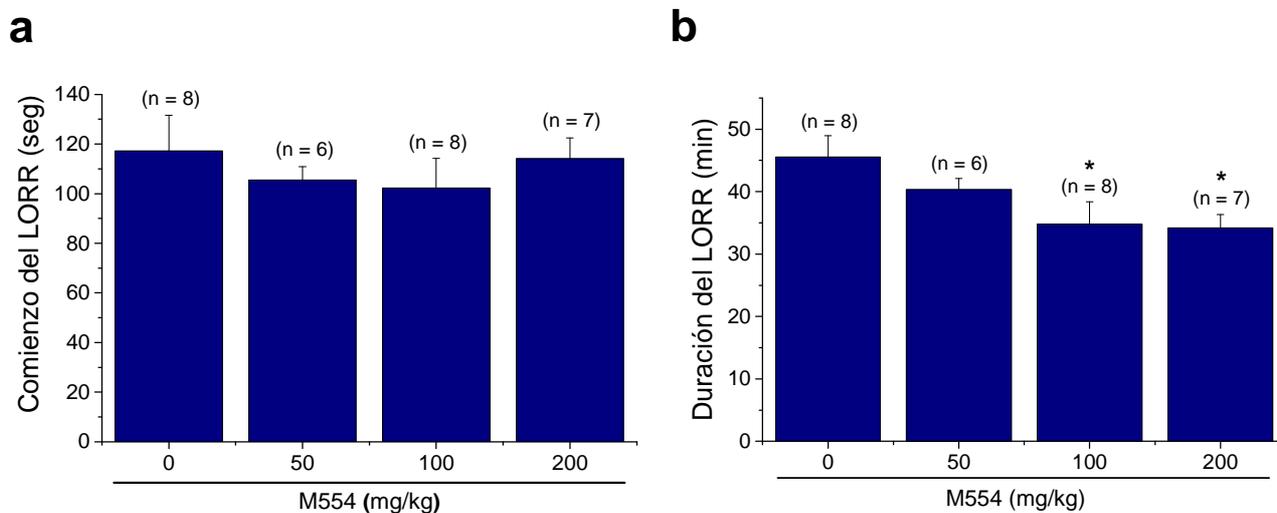


**Figura 29. La molécula M554 atenúa los efectos sedantes de alcohol en ensayos de rotarod acelerado.**

Se realizaron ensayos de rotarod acelerado en ratones C57BL/6J machos. Para mejorar la solubilidad, las moléculas M554 y M890 fueron incluidas en hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). **(a)** Se determinó la coordinación motora cuantificada como latencia a caer antes y después de una inyección de etanol (2,0 g/kg) o salino, en ausencia o presencia de M554 o M890 (100 mg/kg). Se normalizó la latencia a caer con respecto a la condición basal correspondiente al entrenamiento de cada animal. **(b)** Representación gráfica de los valores de latencia a caer normalizados luego de 75 y 105 minutos de las inyecciones que incluían alcohol en presencia de las moléculas indicadas. Los valores representan el promedio  $\pm$  SE. (*two-way repeated measures ANOVA*, análisis post hoc Bonferroni; \*,  $p < 0,05$ ).

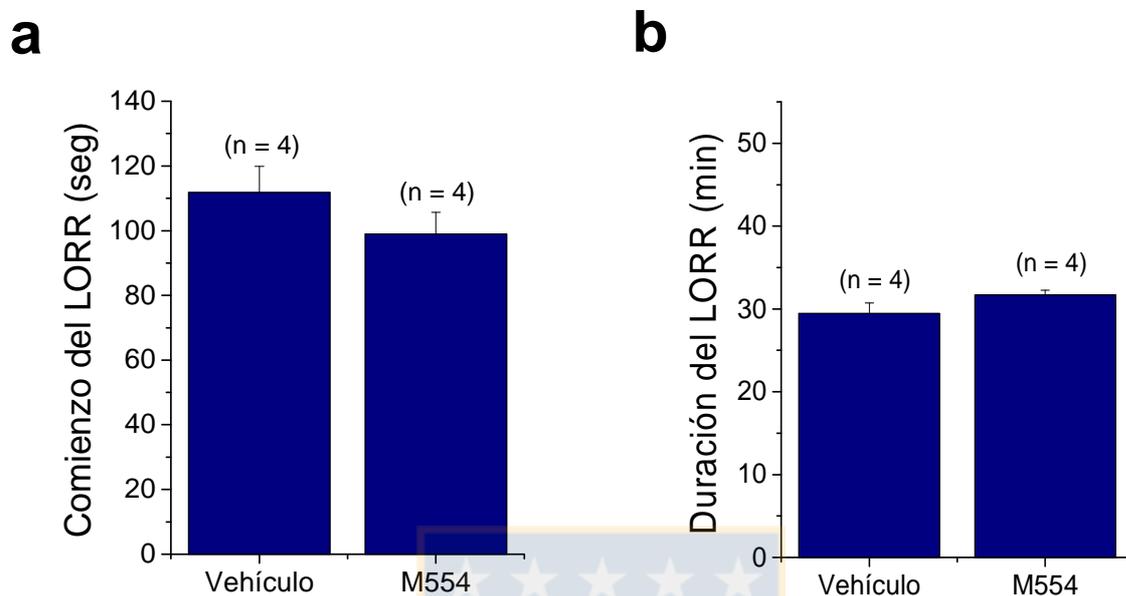
### 3.2.3.3 Ratones C57BL/6J inyectados con M554 se recuperan más rápido en ensayos de LORR

Con el propósito de demostrar el efecto de M554 a una dosis de etanol más alta (3,5 g/kg), se realizaron ensayos de pérdida del reflejo de enderezamiento (loss of righting reflex, LORR). Ratones C57BL/6J fueron co-inyectados con etanol y M554 a diferentes dosis (0, 50, 100 y 200 mg/kg, incluyendo las moléculas en 2-hidroxiopropil  $\beta$ -ciclodextrina), induciendo un estado de sedación e inmovilidad y se controló el tiempo que tardan los ratones en recuperar el reflejo de enderezamiento. No se detectaron diferencias en el tiempo que tardaron en caer (latencia a caer) en ninguna de las condiciones estudiadas (Figuras 30a). De forma interesante, la molécula M554 indujo una recuperación del reflejo de enderezamiento más rápida, reflejado en una disminución de la duración del LORR desde  $45 \pm 3$  minutos en el control a  $34 \pm 3$  minutos en ratones co-inyectados con 100 mg/kg de la molécula (Figura 30b). Este efecto fue concentración dependiente ya que una dosis de 50 mg/kg de M554 no indujo una disminución significativa en la duración del LORR ( $40 \pm 2$  minutos) (Figura 30b). Luego se ensayó la duración del LORR en un ratón KI resistente a los efectos de etanol, debido a una mutación en el dominio intracelular de la subunidad  $\alpha_1$  del GlyR (KK385/386AA GlyR $\alpha_1$ ). No se encontraron diferencias en la duración del LORR entre los grupos control (etanol) y M554 (etanol más M554) ( $29 \pm 1$  y  $31 \pm 1$  minutos respectivamente, Figura 31b), indicando que el efecto de M554 es debido a una intervención en el mecanismo de señalización intracelular en la potenciación por etanol del GlyR.



**Figura 30. M554 inhibe los efectos depresores de altas dosis de etanol en ensayos de pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR).**

Se utilizaron ratones C57BL/6J machos en ensayos de LORR para determinar la capacidad de M554 de alterar el efecto depresor de altas dosis de etanol. Para mejorar la solubilidad, la molécula M554 fue incluida en HP- $\beta$ -CD. **(a)** La gráfica representa el comienzo del LORR en presencia de 3,5 g/kg de etanol a diferentes concentraciones de M554. **(b)** Se cuantificó la duración del LORR inducido por 3,5 g/kg de etanol a diferentes concentraciones de M554. Se redujo el efecto depresor en presencia de M554. Los valores representan el promedio  $\pm$  SE. (\* ANOVA,  $p < 0.05$ ).

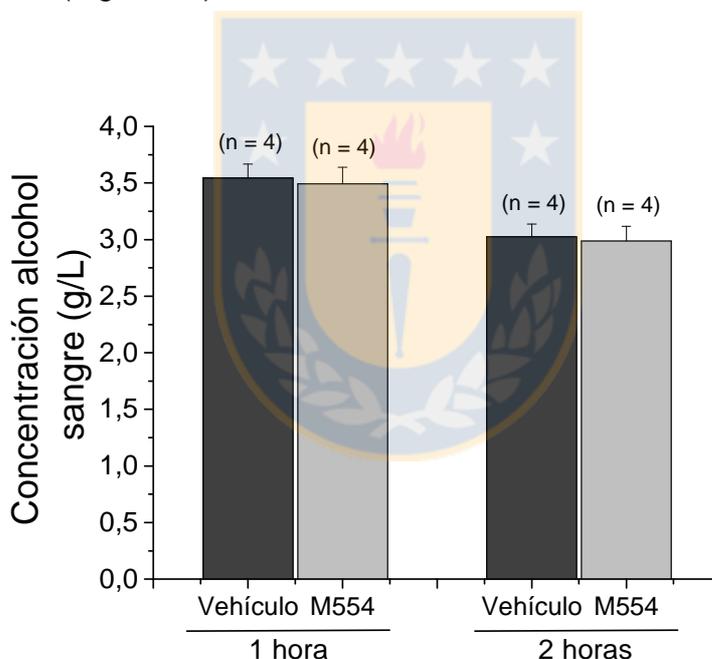


**Figura 31. Efecto de M554 en ensayos de LORR en ratones KI.**

Se utilizaron ratones KI (KK385/386AA GlyR $\alpha_1$ ) machos en ensayos de LORR para determinar la capacidad de M554 de alterar el efecto depresor de altas dosis de etanol. Para mejorar la solubilidad, la molécula M554 fue incluida en HP- $\beta$ -CD. **(a)** Representación gráfica del efecto de M554 en el comienzo del LORR luego de la inyección de 3,5 g/kg de etanol. **(b)** La cuantificación de la duración del LORR indicó que los efectos anestésicos de etanol no fueron alterados en presencia de 100 mg/kg de M554 en ratones KI. Los valores representan el promedio  $\pm$  SE.

### 3.2.3.4 Molécula M554 no altera los niveles de etanol en sangre

Para asegurarse de que las diferencias en comportamiento animal inducido por etanol en presencia de moléculas no son debido a diferencias en la farmacocinética del alcohol producto de M554, se determinó la concentración de alcohol en sangre (BAC) 1 y 2 horas luego de una inyección de etanol (3,5 g/kg). Luego de 1 hora post-inyección la BAC fue de  $3,54 \pm 0,12$  y  $3,49 \pm 0,15$  g/L para la condición control y para la condición de co-inyección con M554, respectivamente. Luego de 2 horas post-inyección, la BAC fue de  $3,02 \pm 0,11$  y  $2,98 \pm 0,13$  mg/dl, respectivamente (Figura 32).



**Figura 32. Concentración de etanol en sangre.**

Ratones C57/BL6J fueron inyectados con etanol de forma sistémica para determinar el efecto de M554 sobre los niveles de etanol en sangre. Se determinó la concentración de alcohol en sangre luego de 60 y 120 minutos de recibir una inyección intraperitoneal de 3,5 g/kg de etanol en ausencia o presencia de M554 (100 mg/kg). Se ensayaron al menos 3 ratones por condición. Los valores representan el promedio  $\pm$  SE.

De esta forma, estos resultados nos indican que la eliminación y el metabolismo del alcohol no difieren entre ratones inyectados con moléculas y controles, por lo que se puede descartar que las diferencias observadas en los ensayos de comportamiento sean debido a diferencias en el metabolismo del etanol producto de la molécula M554.



### **3.2.4 Molécula M554 aumenta los niveles de dopamina en nAc**

Distintos estudios han determinado que la presencia de GlyRs en áreas superiores del cerebro como el nAc y el VTA, estarían relacionado con la regulación de los niveles de DA (Ye 2000; Zheng and Johnson 2001). Una serie de estudios usando microdiálisis *in vivo* en ratas han investigado el rol de los GlyRs en el nAc en la modulación del sistema dopaminérgico mesolímbico (Molander and Soderpalm 2005a, 2005b). En este sentido, la perfusión de glicina en el nAc incrementó los niveles de DA, mientras que la aplicación de estricnina, un antagonista del GlyR, disminuyó los niveles de DA e incrementó el consumo de alcohol. Estudios adicionales han determinado que los niveles de glicina extracelular estarían implicados en modular el consumo y preferencia al alcohol (Molander et al. 2007).

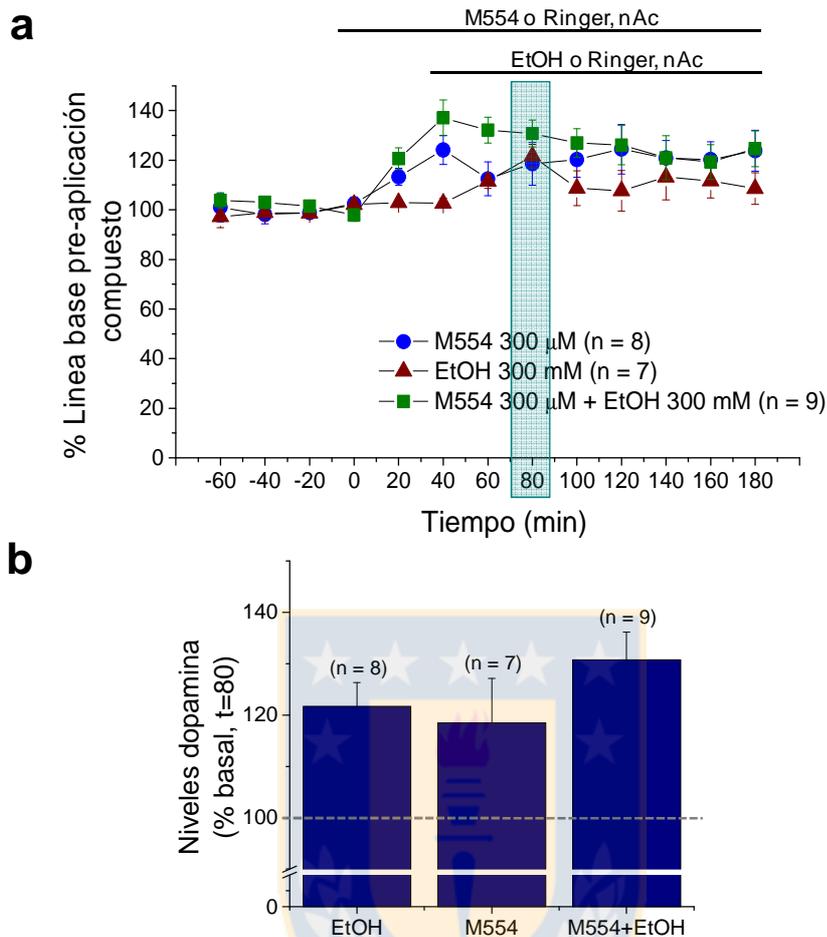
Basado en estos antecedentes, y considerando que contamos con una molécula pequeña capaz de revertir los efectos de etanol en el GlyR, nos formulamos la interrogante sobre cuáles serían los efectos de M554 en los niveles de DA en el nAc luego de la aplicación local y sistémica. Estos datos serían importantes para determinar un potencial efecto de M554 en estudios de comportamiento en animales relacionados con consumo y preferencia por el alcohol.

#### **3.2.4.1 Molécula M554 aumenta los niveles de dopamina en nAc mediante un mecanismo que involucra al GlyR**

Para determinar los efectos de la molécula pequeña M554 en los niveles de DA en el nAc se realizaron experimentos de microdiálisis en ratas Wistar adultas.

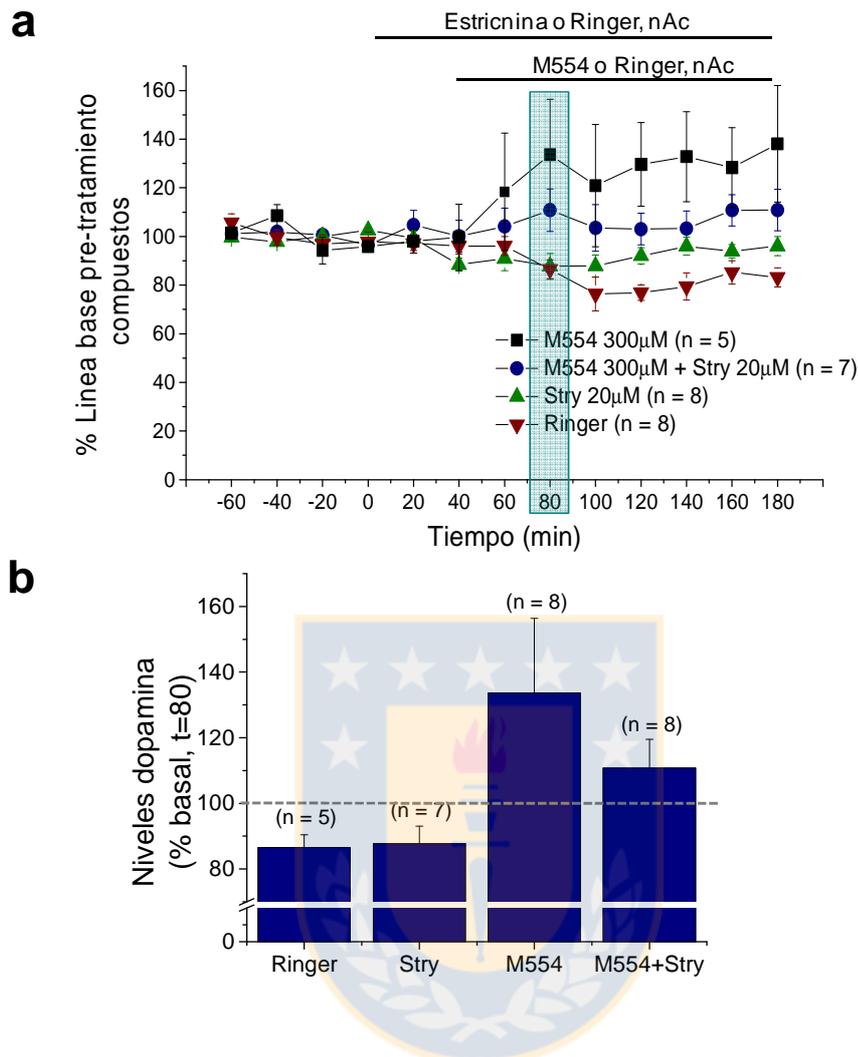
Como ha sido reportado anteriormente (Molander and Soderpalm 2005a), etanol (300mM) aumentó los niveles de DA en nAc, llegando a valores de un  $22\pm 5\%$  por sobre el nivel basal luego de 20 minutos de aplicación. De forma interesante, la aplicación de M554 a una concentración de  $300\ \mu\text{M}$  también indujo un aumento en los niveles de DA luego de 20 minutos de aplicación de hasta un  $24\pm 6\%$  con respecto al nivel basal. Cuando se aplicó ambas drogas al mismo grupo y a la misma concentración anterior, se obtuvo un aumento de los niveles de DA de hasta un  $37\pm 7\%$  con respecto al nivel basal (Figura 33).

Para determinar si este aumento en los niveles de DA son dependientes del GlyR, se realizó un experimento de microdiálisis incluyendo estriknina localmente. Se ha determinado con anterioridad que la aplicación de estriknina revierte el aumento de DA en nAc producto de etanol (Molander and Soderpalm 2005a). En otro conjunto de experimentos nuevamente se observó un aumento en los niveles de DA producto de M554 ( $300\ \mu\text{M}$ ), el cual alcanzó un valor de  $33\pm 23\%$  por sobre los niveles basales luego de 20 minutos de aplicación. Sin embargo, cuando se pre-aplicó  $20\ \mu\text{M}$  de estriknina, el aumento en los niveles de DA llegó sólo a un  $11\pm 9\%$  con respecto al basal (Figura 34). En este mismo experimento, como control se utilizaron grupos de ratas a las cuales se les aplicó estriknina  $20\ \mu\text{M}$  y a otro grupo solución Ringer de tal forma de determinar el cambio en los niveles de DA en el mismo tiempo que se comparó el efecto de M554 (Estriknina:  $-12\pm 5\%$ ; Ringer:  $-13\pm 4\%$ ) (Figura 34). Esto indica que los GlyRs son importantes para el aumento de DA producto de la aplicación local de la molécula M554, ya que estriknina fue capaz de revertir parcialmente este aumento.



**Figura 33. Niveles de dopamina extracelular en nAc usando microdiálisis *in vivo* después de perfusión de M554 o etanol.**

Ratas Wistar machos fueron utilizadas en ensayos de microdiálisis *in vivo* para la determinación de los niveles de DA en nAc en respuesta a la aplicación local de compuesto. **(a)** Se determinaron los niveles de DA en nAc de rata luego de la administración local de M554, etanol y M554 más etanol. Se calculó el porcentaje de cambio con respecto a los niveles de DA correspondiente a la línea base antes de la aplicación del compuesto. **(b)** Representación gráfica de los valores porcentuales del cambio en los niveles de dopamina en el minuto 80 luego de la primera aplicación de compuesto. Los valores se expresan en promedio  $\pm$  SE.



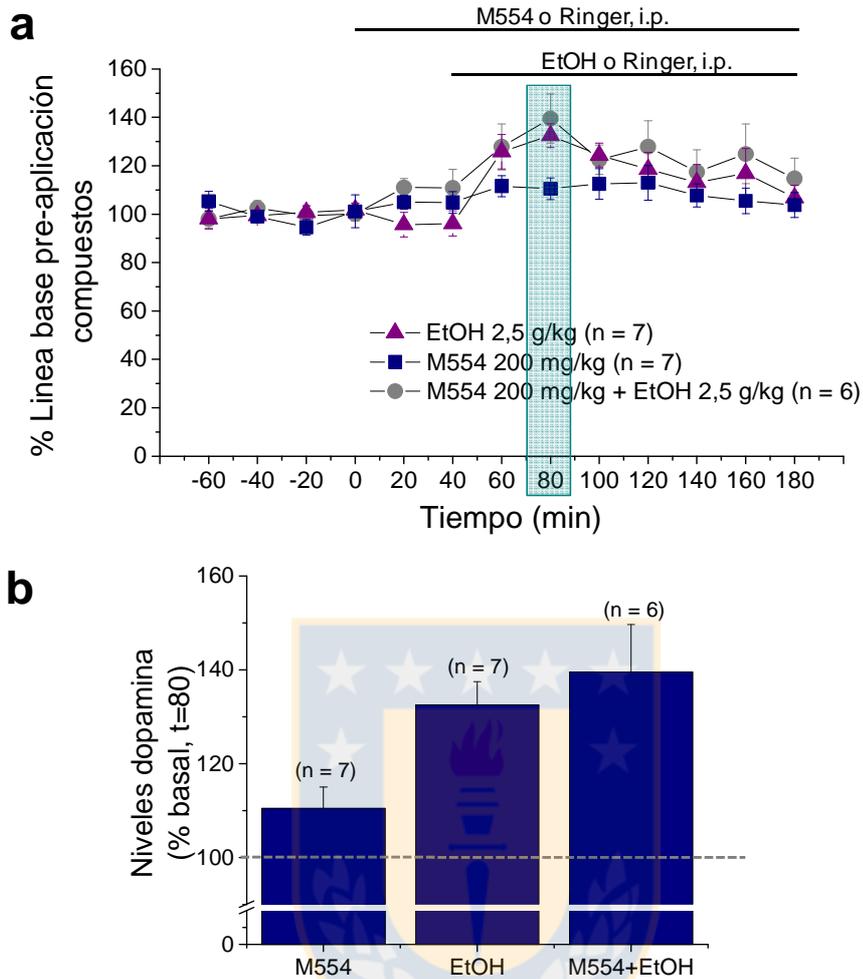
**Figura 34. Efecto de estricnina sobre los niveles de dopamina en nAc.**

Ratas Wistar machos fueron utilizadas en ensayos de microdiálisis in vivo para la determinación de los niveles de DA en nAc en respuesta a la aplicación local de compuesto. **(a)** Se midieron los niveles de dopamina en nAc de rata luego de la administración local de M554, Estricnina y M554+Estricnina. Se calculó el porcentaje de cambio con respecto a los niveles de DA correspondiente a la línea base antes de la aplicación del compuesto. **(b)** Representación gráfica de los valores porcentuales del cambio en los niveles de dopamina en el minuto 80 luego de la primera aplicación. Los valores se expresan en promedio  $\pm$  SE.

### **3.2.4.2 La aplicación sistémica de M554 no aumenta los niveles de DA en nAc de ratas**

Con el objetivo de explorar si es factible realizar ensayos de preferencia y consumo de etanol en presencia de la molécula pequeña M554, fue necesario determinar si la aplicación sistémica de nuestro compuesto es capaz de aumentar los niveles de DA en nAc. Para determinar si M554 llega al sitio de acción y aumenta los niveles de DA en nAc, se realizaron experimentos de microdiálisis aplicando la molécula y etanol en forma sistémica. Para ello, se realizaron inyecciones intraperitoneales de 200 mg/kg de M554 en ratas (incluido en 2-hidroxiopropil  $\beta$ -ciclodextrina), en donde no se observó un aumento en los niveles de DA ( $10\pm 5\%$ , Figura 35). Tal como lo han demostrado estudios previos (Molander and Soderpalm 2005a), la inyección intraperitoneal de 2,5 g/kg de etanol provocó un aumento en los niveles de DA de un  $33\pm 5\%$  con respecto al nivel basal luego de 40 minutos de la aplicación sistémica. La aplicación conjunta de M554 y etanol en otro grupo de ratas usando la misma concentración aplicada en los grupos anteriores, no alteró significativamente este aumento en los niveles de DA producto de etanol ( $39\pm 10\%$ ). Por otro lado, la aplicación de solución Ringer a otro grupo de ratas como control, no alteró los niveles de DA.

Estos resultados nos indican que la molécula M554 luego de su aplicación sistémica no tiene el mismo efecto comprobado al aplicarla directamente en el nAc, por lo que será necesario mejorar a futuro nuestro compuesto en términos de permeabilidad con el objetivo de realizar en forma exitosa ensayos de consumo y preferencia de alcohol en animales.



**Figura 35. Niveles extracelulares de dopamina en nAc después de administración sistémica de M554 o etanol.**

Ratas Wistar machos fueron utilizadas en ensayos de microdiálisis *in vivo* para la determinación de los niveles de DA en nAc en respuesta a la aplicación sistémica de compuesto. **(a)** Se determinaron los niveles de dopamina en nAc de rata luego de la administración sistémica de M554, EtOH y M554+EtOH. Se calculó el porcentaje de cambio con respecto a los niveles de DA correspondiente a la línea base antes de la aplicación del compuesto. **(b)** Representación gráfica de los valores porcentuales del cambio en los niveles de dopamina en el minuto 80 luego de la primera aplicación. Los valores se expresan en promedio  $\pm$  SE.

## 4. DISCUSIÓN

Etanol es la droga de abuso más utilizada a nivel mundial. Siendo un potente depresor del sistema nervioso central (SNC), el consumo agudo altera el funcionamiento normal de los mecanismos de excitabilidad neuronal, provocando fenómenos de desinhibición, relajación, dificultad para hablar, sedación, descoordinación motora, analgesia y en casos más extremos, compromiso de conciencia, coma etílico y muerte por depresión cardiorrespiratoria, mientras que su uso crónico está asociado a la conducta de búsqueda de alcohol, tolerancia, consumo periódico y compulsivo (Vonghia et al. 2008; Spanagel 2009). La intoxicación aguda con etanol no tiene un tratamiento específico y sólo se emplean procedimientos clínicos de estabilización vital. Su mecanismo de acción no está bien dilucidado, siendo varios los sistemas afectados. Al principio se creía que los efectos que producía este alcohol estaban relacionados con alteraciones no específicas en los lípidos de las membranas celulares, sin embargo diversos estudios han demostrado que a concentraciones fisiológicas de etanol esto no ocurría (Peoples, Li, and Weight 1996). Además, se postuló que los principales blancos moleculares de etanol en el sistema nervioso central eran las proteínas y los canales iónicos (Harris 1999). Específicamente se ha estudiado con bastante interés el efecto que produce etanol en los canales iónicos activado por ligando. Los estudios en nuestro laboratorio se han centrado particularmente en el GlyR, el cual se ha demostrado que es modulado por concentraciones farmacológicas de etanol mediante un mecanismo intracelular que depende del dímero  $G\beta\gamma$  (Yevenes

et al. 2003; Yevenes et al. 2006; Yevenes et al. 2008). También se ha determinado la participación de aminoácidos claves presente en el dominio intracelular del receptor, así como también, el efecto de péptidos pequeños que interfieren con la interacción GlyR-G $\beta\gamma$  y por ende, inhibe el efecto de etanol en GlyR (Guzman et al. 2009).

Estos datos han proporcionado la base para desarrollar nuevos modelos animales y para estudiar los efectos de etanol en el SNC (Aguayo et al. 2014; Blednov et al. 2015). Además, estos antecedentes sirven de base para intentar desarrollar terapias basadas en la inhibición selectiva de la interacción entre el GlyR y G $\beta\gamma$  para aliviar los efectos adversos del consumo de alcohol. En este contexto, el presente trabajo ha ampliado el conocimiento a través de la búsqueda de nuevos compuestos que reviertan los efectos de etanol en modelos animales.

#### **4.1 Péptido RQHc7 es un inhibidor del efecto de etanol en GlyRs sinápticos**

Las estrategias destinadas a interferir con las interacciones proteína-proteína desde un comienzo se han basado en la búsqueda de péptidos que imiten una secuencia proteica en particular. En literatura existe una amplia cantidad de estudios que utilizan secuencias peptídicas para interferir con las interacciones proteína-proteína en una gran variedad de proteínas distintas (Chen et al. 1995; Krapivinsky et al. 1998; Kubota and Wakamatsu 2008). Todas estas, destinadas a ejercer algún efecto celular en particular con el objetivo de ser usados como tratamiento en diversas enfermedades, tales como el cáncer (Kazi et

al. 2011). Por otro lado, la utilización de péptidos ha sido útil además para comprender de mejor forma las interacciones proteína-proteína y los determinantes moleculares implicados en ellos (Wade et al. 1994; Shpakov 2011).

Partiendo de la base que ya contamos con un péptido que inhibe el efecto que ejerce etanol sobre el GlyR, nos propusimos averiguar con mayor detalle los aminoácidos importantes en G $\beta$  para la interacción con el GlyR. Usando como antecedente los aminoácidos de G $\beta$  que se determinaron *in silico* como importantes (Asp186, 228 y 246) para la unión del péptido RQHc7 y la subunidad G $\beta$ , se procedió a realizar mutaciones para determinar su efecto en la actividad del receptor de glicina. Se realizaron mutaciones en estos aminoácidos en G $\beta$  por alanina y se realizaron curvas concentración-respuesta a glicina en células HEK293 que sobreexpresaba esta proteína mutada. Tal como se esperaba, el desplazamiento observado en presencia de G $\beta_{1\gamma_2}$  silvestre no fue observado cuando se sobreexpresó G $\beta$  mutado en los aminoácidos 186, 228 y 246, indicando la importancia de estos aminoácidos para la interacción con GlyR. Interesantemente, otros estudios han analizado la habilidad de distintas mutantes de G $\beta\gamma$  para regular la actividad de otros efectores, tales como canales de potasio y calcio, PLC $\beta_2$  y quinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico, los cuales han revelado los residuos en G $\beta$  requeridos para la activación de cada efector y han proporcionado evidencia sobre dominios de solapamiento parcial en G $\beta$  para la regulación de estos efectores (Ford et al. 1998; Davis et al. 2005). Es relevante mencionar que existen 5 subunidades  $\beta$  y 12 subunidades  $\gamma$ , sin embargo en este estudio se sobreexpresó específicamente la subunidad  $\beta_1$  y  $\gamma_2$  debido a que son las más

abundantes en el sistema nervioso central (Clapham and Neer 1997; Dupre et al. 2009). Específicamente ya se había determinado con anterioridad (Yevenes et al. 2003) que la sobreexpresión del dímero  $G\beta\gamma$  inducía un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta del GlyR y que la mutación en alguno de los aminoácidos presente en el dominio intracelular de GlyR revertía este cambio (Yevenes et al. 2006).

Los resultados presentados en esta tesis con relación al péptido RQHc7 indican que este péptido es capaz de inhibir la potenciación del GlyR, tanto en líneas celulares como en cultivos de neuronas, presentando cierta selectividad debido a que no interfirió con la actividad basal de otros efectores de  $G\beta\gamma$ . Su grado de selectividad puede ser debido a que el sitio donde se une el RQHc7 en  $G\beta$  no es compartido completamente con el sitio donde se une PLC $\beta$ 2 o canales GIRK (Ford et al. 1998). Los estudios de inmunocitoquímica demostraron la presencia de RQHc7 al interior de las células luego de incubar por una hora y un grado de solapamiento de un 40% con  $G\beta\gamma$  utilizando el coeficiente de Manders. Este valor es considerado como bajo en estudios de colocalización de señales fluorescentes (Galloway et al. 2009; Zinchuk and Grossenbacher-Zinchuk 2009). Es posible que esto haya ocurrido debido a una baja permeabilidad del péptido, en donde no se haya alcanzado una concentración adecuada al interior de la célula para interactuar con  $G\beta$ . Esto se explica ya que al incubar las células con péptido es muy probable que ingrese por endocitosis, por lo que su capacidad de difundir al citoplasma puede verse limitada, mientras que al incorporar el péptido en la pipeta en los ensayos de electrofisiología, la difusión al interior de la célula está

garantizada. Otra explicación para el bajo nivel de colocación encontrado, es que la adición del fluoróforo FITC al péptido RQHc7 afecte la interacción del péptido con G $\beta$  impidiendo estéricamente que éste se acomode en el sitio de unión.

El siguiente paso en este trabajo fue el de continuar con la búsqueda de pequeños compuestos con el mismo efecto inhibitor, pero enfocándose principalmente en moléculas con características tipo fármaco.

#### **4.2 Búsqueda de moléculas pequeñas con potencial farmacológico**

Reportes previos han demostrado la relevancia del mecanismo intracelular asociado a G $\beta\gamma$  para la modulación del GlyR por etanol y la importancia del dominio intracelular en la interacción G $\beta\gamma$ -GlyR (Yevenes et al. 2006; Yevenes et al. 2008; Aguayo et al. 2014). Basado en esto, se llevó a cabo una serie de estudios *in silico* y experimentos electrofisiológicos para identificar moléculas pequeñas capaces de unirse a G $\beta\gamma$  en el sitio modulador para este canal. Uno de estos compuestos identificado mediante screening virtual, M554, inhibió los efectos de etanol sobre el GlyR en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

El protocolo de screening virtual identificó un conjunto de moléculas pequeñas, las cuales fueron examinadas como inhibidores para los efectos de etanol sobre el GlyR. La estrategia consistió en usar el sitio de G $\beta\gamma$  que interactúa con GlyR para el análisis de una biblioteca de moléculas pequeñas mediante ensayos de interacción *in silico*. Este sitio en G $\beta$  se había determinado en estudios

previos como importante para la unión del péptido RQHc7 (San Martin et al. 2012). En este sentido, el primer parámetro discriminador fue la energía de interacción de las moléculas al sitio en  $G\beta\gamma$  (Fabián Cerda, Tesis Bioingeniería, 2013). Posterior a eso, la técnica de patch clamp nos permitió determinar aquellas moléculas con un efecto funcional inhibitor de la potenciación del GlyR por etanol en células HEK293. La presencia de grupos amida y amina era predecible debido al número de residuos de ácidos aspárticos en el sitio de  $G\beta$  que son importantes para la interacción con GlyR. Esto fue apoyado al realizar el estudio de docking para determinar el sitio de unión de M554 y M890 en  $G\beta$ , en donde se estableció que los principales tipos de unión son electrostática ion-dipolo y de Van der Waal. La modificación de algunos de los grupos químicos en M554 y M890 permitió establecer las regiones en estas moléculas importantes para la interacción con los ácidos aspárticos presentes en  $G\beta$ . Por otro lado, la determinación de un enantiómero activo para cada una de estos compuestos, nos sugiere de una estereoselectividad en nuestras moléculas, lo cual es bastante común en la industria farmacéutica (Andersson and Weidolf 2008).

Como una forma de analizar el efecto de las moléculas pequeñas en el contexto de la actividad sináptica en neuronas en cultivo, se analizaron las corrientes postsinápticas inhibitorias en presencia y ausencia de etanol para evaluar los aspectos cinéticos de los eventos y determinar los efectos de moléculas pequeñas en los modelos de transmisión sináptica en neuronas espinales en cultivo. Etanol incrementó la constante de tiempo de decaimiento, de acuerdo a estudios previos, lo que se relaciona con cambios en la función de

GlyRs postsinápticos (Aguayo et al. 2014; Mariqueo et al. 2014). El efecto producido por M554 y M890 en reducir la potenciación por etanol en la constante de tiempo de decaimiento está de acuerdo con modelos de trabajos que predicen que la inhibición de la interacción  $G\beta\gamma$ -GlyR inhibe la potenciación por etanol de este canal (Yevenes et al. 2008; Guzman et al. 2009). De esta forma, nuestros hallazgos están de acuerdo con el hecho de que  $G\beta\gamma$  ha demostrado ser un importante regulador sináptico, modulando la actividad de LGIC presentes en la membrana postsinápticas (Yevenes et al. 2003; Fischer et al. 2005; San Martin et al. 2012).

Si bien es cierto, en nuestra primera aproximación se observó una inhibición del efecto de etanol con M554 y M890, es importante considerar que este efecto se ensayó en modelos de expresión heteróloga en células HEK293 expresando  $\alpha_1$ GlyRs homoméricos. Sin embargo, los resultados obtenidos en neuronas espinales que expresan GlyRs nativos indicaron que las moléculas pequeñas también son efectivas en receptores  $\alpha_1\beta$ , ya que inhibieron el aumento inducido por etanol de la constante de tiempo de decaimiento. Esto es apoyado por evidencia que indica que GlyRs maduros están localizados en sitios postsinápticos en *clusters* compuestos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Grudzinska et al. 2005), en donde se ha descrito además que la expresión de la subunidad  $\alpha_1$  en neuronas espinales es alta desde los 14 DIV (Malosio et al. 1991).

También se han reportado otros inhibidores de  $G\beta\gamma$  siguiendo una aproximación similar (Bonacci et al. 2006; Wells et al. 2012). Una de estas moléculas pequeñas, llamada M119, se une con alta afinidad a la subunidad  $G\beta$  e

inhibe la señalización PLC $\beta$ 2 *in vitro*. Éstos y otros estudios adicionales han determinado que M119 y la molécula relacionada Galleína son efectivos en modelos animales de inflamación (Lehmann, Seneviratne, and Smrcka 2008), analgesia (Mathews, Smrcka, and Bidlack 2008) y falla cardiaca (Casey et al. 2010). El sitio de unión de M119 es el mismo que el sitio de unión para el estudiado péptido SIGK, el cual está contiguo al sitio de unión de M554. Debido a que M119 no tuvo ningún efecto en la potenciación del GlyR por etanol, se concluye que el sitio de unión de M119 no se comparte con el sitio de unión a M554 en G $\beta$  $\gamma$ .

Como se ha mencionado, el sitio modulador de G $\beta$  $\gamma$  contiene un área de interacción a diferentes efectores como PLC $\beta$ , adenilil ciclasa y GIRK, entre otros. Por lo tanto, fue importante ensayar la especificidad de cualquier molécula diseñada para inhibir la interacción de G $\beta$  $\gamma$  con algún efector en particular. Ambas moléculas seleccionadas, M554 y M890, no tuvieron efecto en la actividad PLC $\beta$ 2 bajo las mismas condiciones en que M119 inhibió el incremento intracelular de Ca<sup>2+</sup> mediado por esta enzima (Bonacci et al. 2006). Del mismo modo, se analizó la actividad de canales GIRK activado por una vía dependiente de G $\beta$  $\gamma$ . Todos los compuestos ensayados, incluyendo M119, inhibieron los canales de tipo GIRK, probablemente debido a que de acuerdo a Ford et al (1998), los ácidos aspárticos importantes (186, 228 y 246) sobre la superficie de G $\beta$  se comparten tanto para la interacción de GlyR como para GIRK.

### 4.3 Toxicidad celular y solubilidad de moléculas pequeñas

Al estudiar la toxicidad celular mediante ensayos *in vitro*, se comprobó que ninguna de las moléculas ensayadas provocó muerte celular bajo las condiciones estudiadas. Sin embargo, los mecanismos mediante el cual un fármaco puede generar toxicidad son tan diversos, que no todos pueden ser evaluados a lo largo de este estudio. La toxicidad de un fármaco podría darse en una serie de situaciones. Una de ellas es que el compuesto se una a un blanco distinto para el cual fue diseñado dando como resultado un efecto adverso. Otra situación que podría darse es la producción de metabolitos tóxicos producto del metabolismo del fármaco, los cuales pueden ser farmacológicamente activos. (Conner et al. 2011).

De todas las moléculas estudiadas, incluyendo los análogos y moléculas derivadas del screening virtual, las moléculas M554-1 y M554-2 fueron las más potentes. Sin embargo, no fue posible continuar trabajando con estas dos moléculas en ensayos posteriores, debido a que presentaron problemas de solubilidad en las condiciones en que se trabajó. Para el uso *in vitro* de las moléculas fue necesaria la utilización de DMSO para su solubilización. Antecedentes previos han demostrado que el uso de DMSO como solvente para moléculas poco solubles o insolubles en agua es la elección adecuada para este tipo de estudios (Guo, Zhou, and Schultz 2000; Chen et al. 2006). Aún en estas condiciones, las moléculas antes mencionadas presentaron pequeños cristales al trabajar a temperatura ambiente, por lo que se consideró descartar estos compuestos y continuar trabajando con M554 y M890 en el resto del trabajo. Los registros indicaron que el vehículo utilizado para solubilizar las moléculas no

modificó la corriente basal de glicina, ni la potenciación por etanol del GlyR. Esto se complementa con estudios previos que indican que DMSO no produce ningún efecto sobre la permeabilidad y conductividad eléctrica cuando se usa a un porcentaje inferior al 2% (Wang et al. 2011).

Ya se ha mencionado la baja solubilidad en agua que presentan las moléculas estudiadas, reflejado en su valor de logS predicho *in silico*. A pesar de que fue posible solubilizar en DMSO y posteriormente preparar las soluciones correspondientes para ensayos *in vitro*, cuando se realizaron estudios preliminares para determinar la concentración a ser usada en estudios en animales, se encontró que la baja solubilidad fue una limitación. Distintos estudios han dado cuenta de la variedad de distintos solventes y estrategias utilizados para la administración de fármacos con baja solubilidad tanto en ensayos en animales (Podolin et al. 2005; Lau et al. 2013), como administración en pacientes con cáncer (Meerum Terwogt et al. 2000; Singla, Garg, and Aggarwal 2002).

El uso de ciclodextrina como complejo de inclusión fue considerado dada la cantidad de estudios que mencionan su utilización para la administración de moléculas con problemas de biodisponibilidad (Loftsson and Brewster 1996; Rajewski and Stella 1996; Laza-Knoerr, Gref, and Couvreur 2010). Las ciclodextrinas son una familia de compuestos formado por oligosacáridos cíclicos formado de seis a ocho unidades de dextrosa ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina) (Stella and He 2008). 2-hidroxilpropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), una alternativa a la  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina, tiene una mejorada solubilidad en agua y es más benigna toxicológicamente hablando (Gould and Scott 2005), por lo que se escogió este

derivado para preparar el compuesto para ser administrado en ensayos en animales. La utilización de HP- $\beta$ -CD consistió en usar una razón en masa de 1:20 para la formación del complejo de inclusión, sin la necesidad de utilizar un solvente orgánico adicional, por lo que se utilizó esta preparación en todos los ensayos de comportamientos realizados en este trabajo.

#### **4.4 Reversión de los efectos de etanol en comportamiento animal mediante moléculas pequeñas**

El GlyR constituye el principal receptor inhibitorio del tronco encefálico y la médula espinal, por lo que el aumento de su actividad inducido por etanol conduce a una serie de efectos en el sistema nervioso central (Lynch 2004). Distintos estudios de comportamiento han demostrado que los GlyRs están implicados en algunos de los efectos agudos de etanol (Williams et al. 1995; Findlay et al. 2002; Blednov et al. 2015). Mediante ensayos de rotarod es posible medir la coordinación motora de un animal, mecanismo que depende de una combinación de reflejos coordinados por la médula espinal y de acciones controladas por regiones supraespinales (Massaquoi SG 1998; Shiotsuki et al. 2010), en los cuales los GlyRs juegan un rol fundamental (Findlay et al. 2002; Blednov et al. 2012), mientras que ensayos de LORR permitan determinar el grado de depresión del sistema nervioso central causado por distintas sustancias, como el alcohol (Williams et al. 1995). Basado en estas evidencias, se determinó el efecto inhibitorio de M554 usando distintas dosis de alcohol en tres ensayos de comportamiento animal: Open Field, Rotarod Acelerado y LORR.

En relación a los ensayos en modelos *in vivo* realizados en este trabajo, al usar bajas dosis de etanol se encontró que hubo un aumento en la actividad exploratoria de los ratones en ensayos de open field, el cual concuerda con estudios previos (Blednov et al. 2011). La administración de M554 no alteró *per se* la actividad exploratoria, ni fue capaz de revertir el aumento que etanol produce en la actividad exploratoria, descartándose por lo tanto que los GlyRs estén participando en este efecto mediante un mecanismo que involucre al dímero G $\beta$  $\gamma$ . Sin embargo, cuando se evaluó la coordinación motora en ensayos de rotarod acelerado usando dosis más altas de etanol se encontró que hubo una recuperación más rápida de la incoordinación motora causada por etanol en presencia de M554, el cual está de acuerdo con resultados previos que indican la importancia del GlyR en la recuperación de la ataxia inducido por etanol en ensayos de rotarod (Blednov et al. 2012).

Para ensayar los efectos agudos de dosis más altas de etanol en animales, se realizaron ensayos de LORR en ratones en presencia de M554. De hecho, el tiempo de sedación inducido por etanol fue aproximadamente un 25% menor en presencia de M554. Se ensayaron distintas concentraciones del M554, encontrándose un efecto concentración dependiente en estos ensayos. La máxima concentración que fue posible utilizar fue de 200 mg/kg, debido a problemas de solubilidad. Cabe destacar que M554 no afectó el comienzo del LORR, lo cual se puede explicar debido a que el compuesto tarda un periodo de tiempo en llegar al sitio de acción y ejercer su efecto. Estudios anteriores han demostrado mediante ensayos de LORR la contribución de los GlyRs en el efecto hipnótico inducido por

etanol (Ye, Sokol, and Bhavsar 2009). De acuerdo con el racional seguido en el presente trabajo, el efecto de etanol producido por la interacción de G $\beta\gamma$  con el dominio intracelular del GlyR es inhibido por la presencia de un compuesto que se une al mismo sitio en G $\beta\gamma$  actuando como un inhibidor competitivo de esta regulación. De esta forma, se espera una recuperación más rápida del reflejo de enderezamiento en ratones inyectados con M554. No obstante, etanol actúa en muchos otros receptores, tal como los GABA<sub>A</sub>Rs (Allan et al. 1987), los cuales podrían jugar un rol igual de importante en la hipnosis inducida por etanol y que podría explicar una de las razones por la que no se observó una reversión total del LORR en presencia de M554. De forma interesante, cuando se realizaron ensayos de LORR en un ratón KI con una mutación en el sitio de unión a G $\beta\gamma$  del GlyR que reduce la modulación intracelular mediada por etanol de la subunidad  $\alpha_1$  del GlyR, no se detectaron diferencias en la duración del LORR inducido por etanol al inyectar en conjunto con M554, indicando que el efecto inhibitorio de M554 es mediado por la subunidad  $\alpha_1$  del GlyR y la proteína de transducción de señal G $\beta\gamma$ . Esto concuerda con resultados que indican que ratones *knockout* que carecen de la subunidad  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  del GlyR no presentan alteración en el LORR inducido por etanol (Blednov et al. 2015), apoyando los resultados que demuestran que la duración de la pérdida de este reflejo está asociada a la subunidad  $\alpha_1$  del GlyR.

En ninguno de los ensayos de comportamiento realizados, se encontraron diferencias en los animales que fueron administrados con M890, ya sea en grupos de animales que se aplicó sólo compuesto o aplicado en conjunto con etanol. A pesar de que en ensayos electrofisiológicos se encontró que este compuesto tenía

un efecto similar a M554 en GlyRs, es posible que problemas de biodisponibilidad en el sitio de acción, una rápida eliminación o metabolismo del compuesto explique la falta de efecto en ensayos en animales.

Es importante considerar en los ensayos de comportamiento animal la correcta elección del grupo de animales a ensayar, considerando una adecuada edad y género del animal. Con respecto a esto último, en nuestros ensayos se utilizaron exclusivamente ratones machos en los ensayos *in vivo*, a excepción de los ensayos de open field en donde usamos indistintamente ratones machos y hembras, no encontrándose diferencias entre éstos. Este mismo efecto se ha visto en estudios anteriores, donde no han encontrado diferencias en los efectos de etanol dependiente del sexo del animal (Blednov et al. 2011). Por otro lado, para los ensayos de rotarod acelerado y LORR, debido a diferencias en cuanto a género, se decidió trabajar solo con ratones machos. Algunos estudios han reportado diferencias entre machos y hembras en el tiempo que permanecen dormido los ratones en ensayos de LORR, siendo las hembras aquellas que duermen un periodo de tiempo más corto (Blednov et al. 2012). Estas diferencias en los efectos de etanol han sido explicados debido a diferencias existentes en los niveles de neuroesteroides entre machos y hembras, que pueden alterar la actividad de algunos neurotransmisores en el cerebro en forma diferencial y por ende, afectando el comportamiento hacia el alcohol (Lancaster 1994).

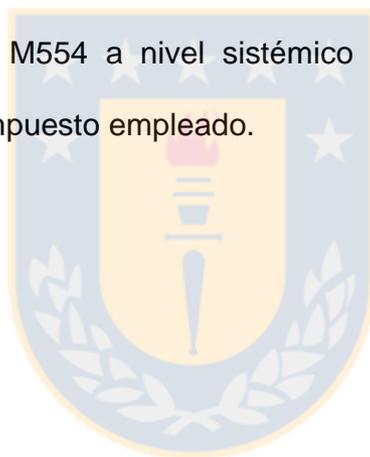
#### **4.5 M554 como potencial compuesto para estudios de consumo y preferencia de alcohol**

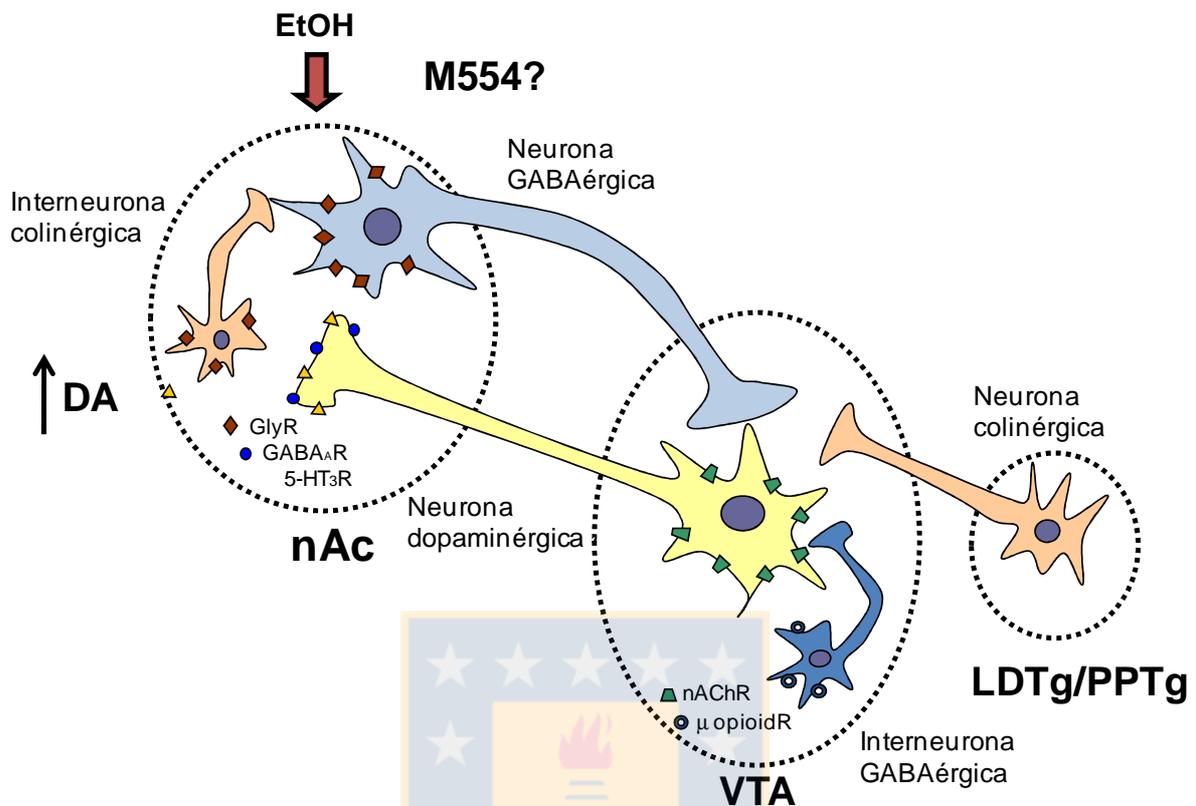
Es bien sabido que las drogas de abuso, incluyendo etanol, activan el sistema dopaminérgico mesolímbico e incrementan los niveles de dopamina en el nAc (Koob and Nestler 1997). Se ha determinado además que los GlyRs jugarían un rol importante en el consumo y preferencia al alcohol en animales (Molander and Soderpalm 2005a; Molander et al. 2007), el cual está relacionado con la capacidad de este receptor de regular la liberación de dopamina en nAc en respuesta a drogas de abuso (Jonsson et al. 2014). En base a estos antecedentes, se decidió ensayar la capacidad de M554 de alterar la liberación de dopamina en nAc en ratas. De forma interesante, los resultados indicaron que la molécula pequeña M554 es capaz de aumentar los niveles de dopamina por sí sola. Cuando se co-aplicó M554 junto con etanol, esta elevación en los niveles de dopamina se mantuvo. Este hallazgo sorprende debido a que se esperaba que M554 tuviera un efecto en la liberación de dopamina producto de etanol. Para determinar si el aumento observado en los niveles de dopamina producto de M554 era un efecto dependiente del GlyR, se realizó una aplicación previa con estricnina, en donde se encontró que este inhibidor revirtió parcialmente el aumento de dopamina producido por M554. Esto nos indicaría que M554 estaría aumentando los niveles de dopamina debido a un aumento en la actividad del GlyR o por un aumento en los niveles de glicina extracelular en el nAc. Una explicación para este efecto es que M554 podría actuar interfiriendo con la modulación tónica de GlyRs presentes en el nAc los cuales participan en la disminución del tono inhibitorio mediado por neuronas GABAérgicas que se proyectan al VTA. De esta forma acetilcolina es

liberado al VTA, donde activa neuronas dopaminérgicas vía nAChRs resultando en una elevación de dopamina en el nAc (Figura 36) (Soderpalm and Ericson 2013).

El mecanismo exacto mediante el cual ocurre esta elevación de DA no se comprende, sin embargo M554 estaría actuando de una manera similar a acamprosato (Campral®; Merk, Darmstadt, Alemania), fármaco actualmente usada en tratamiento contra el alcoholismo. Este compuesto es un derivado sintético de la homotaurina, el cual se ha reportado que previene la recaída durante la detoxificación del alcohol (Littleton 1995; Mason 2005), así como también disminuye el consumo de alcohol en ratas (Boismare et al. 1984; Czachowski, Legg, and Samson 2001; Olive et al. 2002). Estudios de microdiálisis *in vivo* más detallados han señalado que acamprosato aplicado en forma local y sistémica es capaz de aumentar los niveles de dopamina en nAc, mediante un mecanismo que involucra a los GlyRs (Chau, Stomberg, et al. 2010). Además, cuando se administró sistémicamente acamprosato en ratas se encontró que los GlyRs presentes en el nAc están implicados en la disminución en el consumo de alcohol encontrado en estudios anteriores (Chau, Hoifodt-Lido, et al. 2010). Estos antecedentes nos llevaron a pensar que M554 podría tener un efecto similar a acamprosato. Es por ello que se administró M554 en forma sistémica para determinar los niveles de dopamina en nAc y de esta forma proceder con ensayos de consumo de alcohol. Sin embargo, los niveles de dopamina en nAc no aumentaron luego de la administración sistémica de este compuesto, lo que hace pensar que M554 posee problemas de biodisponibilidad en esta región del cerebro. Si bien es cierto, en los ensayos de comportamiento realizado en ratones se

obtuvo un efecto al aplicar sistémicamente el compuesto, es probable que la utilización de una especie distinta en la determinación de los niveles de dopamina, en este caso ratas, conlleven diferencias en la farmacocinética que alteren la biodisponibilidad de M554 en áreas superiores del cerebro como el nAc. Para poder superar este inconveniente sería necesario perfeccionar la estructura del compuesto de tal forma de mejorar algunos de los parámetros relacionado con la permeabilidad y su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Por otra parte, no se descarta que también pudiera haber diferencias a nivel farmacodinámico, cuyo caso resultaría interesante debido a que la interferencia de los efectos de etanol por M554 a nivel sistémico no afectaría los niveles de dopamina a la dosis de compuesto empleado.





**Figura 36. Figura esquemática simplificada de los participantes más importantes que median la activación inducida por etanol del sistema dopaminérgico mesolímbico.**

(nAc: núcleo accumbens, VTA: área tegmental ventral, LDTg: núcleo laterodorsal tegmental, PPTg: núcleo pedúnculo pentino, nAChR: receptor acetilcolina nicotínico, 5-HT<sub>3</sub>R: receptor serotonina tipo 3, μ-opioidR: receptor opioid μ-type). Etanol actúa principalmente en el nAc, donde influencia a los GlyR, los cuales disminuyen el tono inhibitorio mediado por neuronas GABAérgicas que se proyectan al VTA. De esta forma, acetilcolina es liberado al VTA, donde activa neuronas dopaminérgicas vía nAChRs específicos resultando en una elevación de dopamina en el nAc (*Modificado de Söderpalm and Ericson, 2013*).

Aunque no se detectó un aumento en los niveles de dopamina luego de la administración sistémica en los ensayos de microdiálisis *in vivo*, no cabe duda que variantes químicas de M554 se transformarán en elementos prometedores para ensayos de consumo de alcohol en animales.

En resumen, se identificó una molécula pequeña capaz de inhibir los efectos de etanol en el GlyR en ensayos *in vitro* e *in vivo* mediante un mecanismo que involucra al dímero G $\beta\gamma$  como blanco farmacológico siguiendo una estrategia de diseño racional. El diseño del compuesto partiendo desde una estrategia *in silico*, nos permitió obtener una molécula que fue activa y que inhibió parcialmente los efectos de etanol en comportamiento animal usando altas dosis de etanol. Aunque esta aproximación fue exitosa, es necesario optimizar nuestro compuesto con el objetivo de obtener variantes con mejorada permeabilidad, estabilidad y solubilidad. La importancia de usar esta vía de señalización en la reversión de los efectos de etanol en el GlyR, es que no se altera la función basal del receptor ya que la molécula va dirigida a interferir con un mecanismo modulador y no en la activación directa del canal. Esto pudo ser observado en la mayoría de los estudios realizados, donde M554 *per se* no alteró ningún parámetro en ensayos de comportamiento, a excepción de la liberación de dopamina en nAc, cuyo mecanismo exacto mediante el cual ocurre este fenómeno es desconocido y no se descarta la participación de otras vías de señalización o receptores diferentes al GlyR, que esté provocando este aumento en los niveles de dopamina.

Estos hallazgos son de gran importancia, debido a que ésta es la primera molécula reportada que revierte parcialmente los efectos agudos de alcohol en

modelos *in vivo*. Estos resultados proporcionan información que podría ser útil en el diseño de moléculas mejoradas para el tratamiento de problemas médicos relacionadas con esta droga las cuales son encontradas en las salas de urgencia tales como intoxicaciones agudas por alcohol.



## CONCLUSIONES

Los hallazgos de mayor relevancia que permiten aceptar la hipótesis planteada en este trabajo consideran:

- El péptido RQHc7 fue capaz de inhibir la potenciación del GlyR por etanol en modelo de neuronas espinales, no interfiriendo con la activación dependiente de PLC $\beta$ 2 y canales GIRK.
- Los aminoácidos Asp186, Asp228 y Asp246 presentes en G $\beta$  son importantes para la modulación del GlyR por el dímero G $\beta\gamma$ .
- Se identificó un compuesto capaz de inhibir la potenciación del GlyR por etanol llamado M554, el cual tiene un efecto estereoselectivo.
- M554 fue capaz de revertir algunos de los efectos *in vivo* producidos por etanol en ensayos de rotarod acelerado y ensayos de LORR.
- Los niveles de etanol en sangre no son afectados luego de la administración de M554, indicando que el efecto encontrado en comportamiento animal no se debe a una diferencia en la concentración de alcohol en sangre.
- Los niveles de dopamina en nAc aumentan en presencia de M554 mediante un mecanismo que involucra a los GlyRs.

## REFERENCIAS

- Aguayo, L. G., P. Castro, T. Mariqueo, B. Muñoz, W. Xiong, L. Zhang, D. M. Lovinger, and G. E. Homanics. 2014. 'Altered sedative effects of ethanol in mice with alpha1 glycine receptor subunits that are insensitive to Gbetagamma modulation', *Neuropsychopharmacology*, 39: 2538-48.
- Aguayo, L. G., and F. C. Pancetti. 1994. 'Ethanol modulation of the gamma-aminobutyric acidA- and glycine-activated Cl- current in cultured mouse neurons', *J Pharmacol Exp Ther*, 270: 61-9.
- Aguayo, L. G., J. C. Tapia, and F. C. Pancetti. 1996. 'Potentiation of the glycine-activated Cl- current by ethanol in cultured mouse spinal neurons', *J Pharmacol Exp Ther*, 279: 1116-22.
- Aguayo, L. G., B. van Zundert, J. C. Tapia, M. A. Carrasco, and F. J. Alvarez. 2004. 'Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development', *Brain Res Brain Res Rev*, 47: 33-45.
- Allan, A. M., J. P. Huidobro-Toro, V. Bleck, and R. A. Harris. 1987. 'Alcohol and the GABA receptor-chloride channel complex of brain', *Alcohol Alcohol Suppl*, 1: 643-6.
- Andersson, T., and L. Weidolf. 2008. 'Stereoselective disposition of proton pump inhibitors', *Clin Drug Investig*, 28: 263-79.
- Aruga, A., N. Takeshita, Y. Kotera, R. Okuyama, N. Matsushita, T. Ohta, K. Takeda, and M. Yamamoto. 2014. 'Phase I clinical trial of multiple-peptide vaccination for patients with advanced biliary tract cancer', *J Transl Med*, 12: 61.
- Bernier, M., H. K. Kole, C. Montrose-Rafizadeh, and S. Kole. 2000. 'Discrete region of the insulin receptor carboxyl terminus plays key role in insulin action', *J Cell Biochem*, 78: 160-9.
- Blednov, Y. A., J. M. Benavidez, M. Black, C. R. Leiter, E. Osterndorff-Kahanek, and R. A. Harris. 2015. 'Glycine receptors containing alpha2 or alpha3 subunits regulate specific ethanol-mediated behaviors', *J Pharmacol Exp Ther*, 353: 181-91.

- Blednov, Y. A., J. M. Benavidez, G. E. Homanics, and R. A. Harris. 2012. 'Behavioral characterization of knockin mice with mutations M287L and Q266I in the glycine receptor alpha1 subunit', *J Pharmacol Exp Ther*, 340: 317-29.
- Blednov, Y. A., C. M. Borghese, M. L. McCracken, J. M. Benavidez, C. R. Geil, E. Osterndorff-Kahaneck, D. F. Werner, S. Iyer, A. Swihart, N. L. Harrison, G. E. Homanics, and R. A. Harris. 2011. 'Loss of ethanol conditioned taste aversion and motor stimulation in knockin mice with ethanol-insensitive alpha2-containing GABA(A) receptors', *J Pharmacol Exp Ther*, 336: 145-54.
- Bode, D. C., and P. B. Molinoff. 1988. 'Effects of ethanol in vitro on the beta adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system', *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 1040-7.
- Boismare, F., M. Daoust, N. Moore, C. Saligaut, J. P. Lhuintre, P. Chretien, and J. Durlach. 1984. 'A homotaurine derivative reduces the voluntary intake of ethanol by rats: are cerebral GABA receptors involved?', *Pharmacol Biochem Behav*, 21: 787-9.
- Bonacci, T. M., J. L. Mathews, C. Yuan, D. M. Lehmann, S. Malik, D. Wu, J. L. Font, J. M. Bidlack, and A. V. Smrcka. 2006. 'Differential targeting of Gbetagamma-subunit signaling with small molecules', *Science*, 312: 443-6.
- Bormann, J., N. Rundstrom, H. Betz, and D. Langosch. 1994. 'Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers', *EMBO J*, 13: 1493.
- Cascio, M. 2004. 'Structure and function of the glycine receptor and related nicotinic receptors', *J Biol Chem*, 279: 19383-6.
- Casey, L. M., A. R. Pistner, S. L. Belmonte, D. Migdalovich, O. Stolpnik, F. E. Nwakanma, G. Vorobiof, O. Dunaevsky, A. Matavel, C. M. Lopes, A. V. Smrcka, and B. C. Blaxall. 2010. 'Small molecule disruption of G beta gamma signaling inhibits the progression of heart failure', *Circ Res*, 107: 532-9.
- Clapham, D. E., and E. J. Neer. 1997. 'G protein beta gamma subunits', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 167-203.

- Clark, R. D., A. Strizhev, J. M. Leonard, J. F. Blake, and J. B. Matthew. 2002. 'Consensus scoring for ligand/protein interactions', *J Mol Graph Model*, 20: 281-95.
- Conner, M. W., C. Dorian-Conner, L. C. Green, S. R. Armstrong, A. C. M. Taniguchi, H. Tashjian and, and D. E. Golan. 2011. 'Principles of Pharmacology', *L. W. Wilkins. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins*, 5.
- Czachowski, C. L., B. H. Legg, and H. H. Samson. 2001. 'Effects of acamprosate on ethanol-seeking and self-administration in the rat', *Alcohol Clin Exp Res*, 25: 344-50.
- Chau, P., H. Hoifodt-Lido, E. Lof, B. Soderpalm, and M. Ericson. 2010. 'Glycine receptors in the nucleus accumbens involved in the ethanol intake-reducing effect of acamprosate', *Alcohol Clin Exp Res*, 34: 39-45.
- Chau, P., R. Stomberg, A. Fagerberg, B. Soderpalm, and M. Ericson. 2010. 'Glycine receptors involved in acamprosate's modulation of accumbal dopamine levels: an in vivo microdialysis study', *Alcohol Clin Exp Res*, 34: 32-8.
- Chen, J., M. DeVivo, J. Dingus, A. Harry, J. Li, J. Sui, D. J. Carty, J. L. Blank, J. H. Exton, R. H. Stoffel, and et al. 1995. 'A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits', *Science*, 268: 1166-9.
- Chen, S., J. T. Do, Q. Zhang, S. Yao, F. Yan, E. C. Peters, H. R. Scholer, P. G. Schultz, and S. Ding. 2006. 'Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 17266-71.
- Dahlstrom, A., and K. Fuxe. 1964. 'Localization of monoamines in the lower brain stem', *Experientia*, 20: 398-9.
- Davis, T. L., T. M. Bonacci, S. R. Sprang, and A. V. Smrcka. 2005. 'Structural and molecular characterization of a preferred protein interaction surface on G protein beta gamma subunits', *Biochemistry*, 44: 10593-604.
- Du, J., W. Lu, S. Wu, Y. Cheng, and E. Gouaux. 2015. 'Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy', *Nature*, 526: 224-9.

- Dupre, D. J., M. Robitaille, R. V. Rebois, and T. E. Hebert. 2009. 'The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 49: 31-56.
- Eggers, E. D., and A. J. Berger. 2004. 'Mechanisms for the modulation of native glycine receptor channels by ethanol', *J Neurophysiol*, 91: 2685-95.
- Eggers, E. D., J. A. O'Brien, and A. J. Berger. 2000. 'Developmental changes in the modulation of synaptic glycine receptors by ethanol', *J Neurophysiol*, 84: 2409-16.
- Findlay, G. S., M. J. Wick, M. P. Mascia, D. Wallace, G. W. Miller, R. A. Harris, and Y. A. Blednov. 2002. 'Transgenic expression of a mutant glycine receptor decreases alcohol sensitivity of mice', *J Pharmacol Exp Ther*, 300: 526-34.
- Finkelstein, A. V., A. Y. Badretdinov, and O. B. Ptitsyn. 1991. 'Physical reasons for secondary structure stability: alpha-helices in short peptides', *Proteins*, 10: 287-99.
- Fischer, H., D. M. Liu, A. Lee, J. C. Harries, and D. J. Adams. 2005. 'Selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel subunits by Go-protein subunits', *J Neurosci*, 25: 3571-7.
- Ford, C. E., N. P. Skiba, H. Bae, Y. Daaka, E. Reuveny, L. R. Shekter, R. Rosal, G. Weng, C. S. Yang, R. Iyengar, R. J. Miller, L. Y. Jan, R. J. Lefkowitz, and H. E. Hamm. 1998. 'Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors', *Science*, 280: 1271-4.
- Galloway, S., R. Takechi, M. M. Pallebage-Gamarallage, S. S. Dhaliwal, and J. C. Mamo. 2009. 'Amyloid-beta colocalizes with apolipoprotein B in absorptive cells of the small intestine', *Lipids Health Dis*, 8: 46.
- Gould, S., and R. C. Scott. 2005. '2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review', *Food Chem Toxicol*, 43: 1451-9.
- Grudzinska, J., R. Schemm, S. Haeger, A. Nicke, G. Schmalzing, H. Betz, and B. Laube. 2005. 'The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors', *Neuron*, 45: 727-39.
- Guo, Z., D. Zhou, and P. G. Schultz. 2000. 'Designing small-molecule switches for protein-protein interactions', *Science*, 288: 2042-5.

- Guzman, L., G. Moraga-Cid, A. Avila, M. Figueroa, G. E. Yevenes, J. Fuentealba, and L. G. Aguayo. 2009. 'Blockade of ethanol-induced potentiation of glycine receptors by a peptide that interferes with Gbetagamma binding', *J Pharmacol Exp Ther*, 331: 933-9.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. 'Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches', *Pflugers Arch*, 391: 85-100.
- Harris, R. A. 1999. 'Ethanol actions on multiple ion channels: which are important?', *Alcohol Clin Exp Res*, 23: 1563-70.
- Harvey, R. J., U. B. Depner, H. Wassle, S. Ahmadi, C. Heindl, H. Reinold, T. G. Smart, K. Harvey, B. Schutz, O. M. Abo-Salem, A. Zimmer, P. Poisbeau, H. Welzl, D. P. Wolfer, H. Betz, H. U. Zeilhofer, and U. Muller. 2004. 'GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization', *Science*, 304: 884-7.
- Hillemacher, T., A. Heberlein, M. A. Muschler, S. Bleich, and H. Frieling. 2011. 'Opioid modulators for alcohol dependence', *Expert Opin Investig Drugs*, 20: 1073-86.
- Huang, X., H. Chen, K. Michelsen, S. Schneider, and P. L. Shaffer. 2015. 'Crystal structure of human glycine receptor-alpha3 bound to antagonist strychnine', *Nature*, 526: 277-80.
- Ikeda, S. R. 1996. 'Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits', *Nature*, 380: 255-8.
- Jones, K. A., B. Borowsky, J. A. Tamm, D. A. Craig, M. M. Durkin, M. Dai, W. J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L. Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J. A. Salon, K. Morse, T. Laz, K. E. Smith, D. Nagarathnam, S. A. Noble, T. A. Branchek, and C. Gerald. 1998. 'GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2', *Nature*, 396: 674-9.
- Jonsson, S., L. Adermark, M. Ericson, and B. Soderpalm. 2014. 'The involvement of accumbal glycine receptors in the dopamine-elevating effects of addictive drugs', *Neuropharmacology*, 82: 69-75.

- Kamal, F. A., A. V. Smrcka, and B. C. Blaxall. 2011. 'Taking the heart failure battle inside the cell: Small molecule targeting of Gbetagamma subunits', *J Mol Cell Cardiol*.
- Kazi, A., J. Sun, K. Doi, S. S. Sung, Y. Takahashi, H. Yin, J. M. Rodriguez, J. Becerril, N. Berndt, A. D. Hamilton, H. G. Wang, and S. M. Sebt. 2011. 'The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner', *J Biol Chem*, 286: 9382-92.
- Kirui, J. K., Y. Xie, D. W. Wolff, H. Jiang, P. W. Abel, and Y. Tu. 'Gbetagamma signaling promotes breast cancer cell migration and invasion', *J Pharmacol Exp Ther*, 333: 393-403.
- Kole, H. K., M. J. Garant, S. Kole, and M. Bernier. 1996. 'A peptide-based protein-tyrosine phosphatase inhibitor specifically enhances insulin receptor function in intact cells', *J Biol Chem*, 271: 14302-7.
- Konig, B., and M. Gratzel. 1994. 'Site of dopamine D1 receptor binding to Gs protein mapped with synthetic peptides', *Biochim Biophys Acta*, 1223: 261-6.
- Koob, G. F., and E. J. Nestler. 1997. 'The neurobiology of drug addiction', *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 9: 482-97.
- Koob, G. F., S. Rassnick, S. Heinrichs, and F. Weiss. 1994. 'Alcohol, the reward system and dependence', *EXS*, 71: 103-14.
- Krapivinsky, G., M. E. Kennedy, J. Nemeč, I. Medina, L. Krapivinsky, and D. E. Clapham. 1998. 'Gbeta binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K<sup>+</sup> channel activation', *J Biol Chem*, 273: 16946-52.
- Krowicki, Z. K., and D. R. Kapusta. 2011. 'Microinjection of glycine into the hypothalamic paraventricular nucleus produces diuresis, natriuresis, and inhibition of central sympathetic outflow', *J Pharmacol Exp Ther*, 337: 247-55.
- Kubota, M., and K. Wakamatsu. 2008. 'Peptide fragment of the m3 muscarinic acetylcholine receptor activates G(q) but not G(i2)', *J Pept Sci*, 14: 998-1002.
- Lancaster, F. E. 1994. 'Gender differences in the brain: implications for the study of human alcoholism', *Alcohol Clin Exp Res*, 18: 740-6.

- Lau, T., E. Chan, M. Callow, J. Waaler, J. Boggs, R. A. Blake, S. Magnuson, A. Sambrone, M. Schutten, R. Firestein, O. Machon, V. Korinek, E. Choo, D. Diaz, M. Merchant, P. Polakis, D. D. Holsworth, S. Krauss, and M. Costa. 2013. 'A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth', *Cancer Res*, 73: 3132-44.
- Laube, B., G. Maksay, R. Schemm, and H. Betz. 2002. 'Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses?', *Trends Pharmacol Sci*, 23: 519-27.
- Laza-Knoerr, A. L., R. Gref, and P. Couvreur. 2010. 'Cyclodextrins for drug delivery', *J Drug Target*, 18: 645-56.
- Leeson, P. 2012. 'Drug discovery: Chemical beauty contest', *Nature*, 481: 455-6.
- Legendre, P. 2001. 'The glycinergic inhibitory synapse', *Cell Mol Life Sci*, 58: 760-93.
- Lehmann, D. M., A. M. Seneviratne, and A. V. Smrcka. 2008. 'Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation', *Mol Pharmacol*, 73: 410-8.
- Lew, P. D., A. Monod, K. H. Krause, F. A. Waldvogel, T. J. Biden, and W. Schlegel. 1986. 'The role of cytosolic free calcium in the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4-trisphosphate in HL-60 cells. Differential effects of chemotactic peptide receptor stimulation at distinct Ca<sup>2+</sup> levels', *J Biol Chem*, 261: 13121-7.
- Lin, Y., and A. V. Smrcka. 2011. 'Understanding molecular recognition by G protein betagamma subunits on the path to pharmacological targeting', *Mol Pharmacol*, 80: 551-7.
- Littleton, J. 1995. 'Acamprosate in alcohol dependence: how does it work?', *Addiction*, 90: 1179-88.
- Loftsson, T., and M. E. Brewster. 1996. 'Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization', *J Pharm Sci*, 85: 1017-25.

- Logothetis, D. E., Y. Kurachi, J. Galper, E. J. Neer, and D. E. Clapham. 1987. 'The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart', *Nature*, 325: 321-6.
- Lynch, J. W. 2004. 'Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel', *Physiol Rev*, 84: 1051-95.
- . 2009. 'Native glycine receptor subtypes and their physiological roles', *Neuropharmacology*, 56: 303-9.
- Mahon, M. J., T. M. Bonacci, P. Divieti, and A. V. Smrcka. 2006. 'A docking site for G protein betagamma subunits on the parathyroid hormone 1 receptor supports signaling through multiple pathways', *Mol Endocrinol*, 20: 136-46.
- Malosio, M. L., B. Marqueze-Pouey, J. Kuhse, and H. Betz. 1991. 'Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain', *EMBO J*, 10: 2401-9.
- Mann, K. 2004. 'Pharmacotherapy of alcohol dependence: a review of the clinical data', *CNS Drugs*, 18: 485-504.
- Mariqueo, T. A., A. Agurto, B. Munoz, L. San Martin, C. Coronado, E. J. Fernandez-Perez, P. Murath, A. Sanchez, G. E. Homanics, and L. G. Aguayo. 2014. 'Effects of ethanol on glycinergic synaptic currents in mouse spinal cord neurons', *J Neurophysiol*, 111: 1940-8.
- Marqusee, S., V. H. Robbins, and R. L. Baldwin. 1989. 'Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 5286-90.
- Mascia, M. P., M. J. Wick, L. D. Martinez, and R. A. Harris. 1998. 'Enhancement of glycine receptor function by ethanol: role of phosphorylation', *Br J Pharmacol*, 125: 263-70.
- Mason, B. J. 2005. 'Acamprosate in the treatment of alcohol dependence', *Expert Opin Pharmacother*, 6: 2103-15.
- Massaquoi SG, Hallett M. 1998. 'Ataxia and other cerebellar syndromes. In: Jankovic J, Tolosa E, editors.', *Parkinson's disease and movement disorders*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998.

- Mathews, J. L., A. V. Smrcka, and J. M. Bidlack. 2008. 'A novel Gbetagamma-subunit inhibitor selectively modulates mu-opioid-dependent antinociception and attenuates acute morphine-induced antinociceptive tolerance and dependence', *J Neurosci*, 28: 12183-9.
- McCracken, L. M., Y. A. Blednov, J. R. Trudell, J. M. Benavidez, H. Betz, and R. A. Harris. 2013. 'Mutation of a zinc-binding residue in the glycine receptor alpha1 subunit changes ethanol sensitivity in vitro and alcohol consumption in vivo', *J Pharmacol Exp Ther*, 344: 489-500.
- Meerum Terwogt, J., O. van Tellingen, V. R. Nannan Panday, M. T. Huizing, J. H. Schellens, W. W. ten Bokkel Huinink, M. U. Boschma, G. Giaccone, C. H. Veenhof, and J. H. Beijnen. 2000. 'Cremophor EL pharmacokinetics in a phase I study of paclitaxel (Taxol) and carboplatin in non-small cell lung cancer patients', *Anticancer Drugs*, 11: 687-94.
- Mihic, S. J., Q. Ye, M. J. Wick, V. V. Koltchine, M. D. Krasowski, S. E. Finn, M. P. Mascia, C. F. Valenzuela, K. K. Hanson, E. P. Greenblatt, R. A. Harris, and N. L. Harrison. 1997. 'Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors', *Nature*, 389: 385-9.
- Molander, A., H. H. Lido, E. Lof, M. Ericson, and B. Soderpalm. 2007. 'The glycine reuptake inhibitor Org 25935 decreases ethanol intake and preference in male wistar rats', *Alcohol Alcohol*, 42: 11-8.
- Molander, A., and B. Soderpalm. 2005a. 'Accumbal strychnine-sensitive glycine receptors: an access point for ethanol to the brain reward system', *Alcohol Clin Exp Res*, 29: 27-37.
- . 2005b. 'Glycine receptors regulate dopamine release in the rat nucleus accumbens', *Alcohol Clin Exp Res*, 29: 17-26.
- Moss, S. J., and T. G. Smart. 2001. 'Constructing inhibitory synapses', *Nat Rev Neurosci*, 2: 240-50.
- Munch, G., C. Dees, M. Hekman, and D. Palm. 1991. 'Multisite contacts involved in coupling of the beta-adrenergic receptor with the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein. Structural and functional studies by beta-receptor-site-specific synthetic peptides', *Eur J Biochem*, 198: 357-64.

- Olive, M. F., M. A. Nannini, C. J. Ou, H. N. Koenig, and C. W. Hodge. 2002. 'Effects of acute acamprosate and homotaurine on ethanol intake and ethanol-stimulated mesolimbic dopamine release', *Eur J Pharmacol*, 437: 55-61.
- Padgett, C. L., and P. A. Slesinger. 2010. 'GABAB receptor coupling to G-proteins and ion channels', *Adv Pharmacol*, 58: 123-47.
- Peoples, R. W., C. Li, and F. F. Weight. 1996. 'Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36: 185-201.
- Peters, C., E. J. Fernandez-Perez, C. F. Burgos, M. P. Espinoza, C. Castillo, J. C. Urrutia, V. A. Streltsov, C. Opazo, and L. G. Aguayo. 2013. 'Inhibition of amyloid beta-induced synaptotoxicity by a pentapeptide derived from the glycine zipper region of the neurotoxic peptide', *Neurobiol Aging*, 34: 2805-14.
- Podolin, P. L., J. F. Callahan, B. J. Bolognese, Y. H. Li, K. Carlson, T. G. Davis, G. W. Mellor, C. Evans, and A. K. Roshak. 2005. 'Attenuation of murine collagen-induced arthritis by a novel, potent, selective small molecule inhibitor of I $\kappa$ B Kinase 2, TPCA-1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide), occurs via reduction of proinflammatory cytokines and antigen-induced T cell Proliferation', *J Pharmacol Exp Ther*, 312: 373-81.
- Rajendra, S., R. J. Vandenberg, K. D. Pierce, A. M. Cunningham, P. W. French, P. H. Barry, and P. R. Schofield. 1995. 'The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element', *EMBO J*, 14: 2987-98.
- Rajewski, R. A., and V. J. Stella. 1996. 'Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery', *J Pharm Sci*, 85: 1142-69.
- Ruiz-Velasco, V., and S. R. Ikeda. 2000. 'Multiple G-protein betagamma combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons', *J Neurosci*, 20: 2183-91.
- San Martin, L., F. Cerda, V. Jimenez, J. Fuentealba, B. Munoz, L. G. Aguayo, and L. Guzman. 2012. 'Inhibition of the Ethanol-induced Potentiation of alpha1

- Glycine Receptor by a Small Peptide That Interferes with Gbetagamma Binding', *J Biol Chem*, 287: 40713-21.
- Scott, J. K., S. F. Huang, B. P. Gangadhar, G. M. Samoriski, P. Clapp, R. A. Gross, R. Taussig, and A. V. Smrcka. 2001. 'Evidence that a protein-protein interaction 'hot spot' on heterotrimeric G protein betagamma subunits is used for recognition of a subclass of effectors', *EMBO J*, 20: 767-76.
- Schmid, K., G. Bohmer, and K. Gebauer. 1991. 'Glycine receptor-mediated fast synaptic inhibition in the brainstem respiratory system', *Respir Physiol*, 84: 351-61.
- Sebe, J. Y., E. D. Eggers, and A. J. Berger. 2003. 'Differential effects of ethanol on GABA(A) and glycine receptor-mediated synaptic currents in brain stem motoneurons', *J Neurophysiol*, 90: 870-5.
- Shiotsuki, H., K. Yoshimi, Y. Shimo, M. Funayama, Y. Takamatsu, K. Ikeda, R. Takahashi, S. Kitazawa, and N. Hattori. 2010. 'A rotarod test for evaluation of motor skill learning', *J Neurosci Methods*, 189: 180-5.
- Shoichet, B. K. 2004. 'Virtual screening of chemical libraries', *Nature*, 432: 862-5.
- Shoichet, B. K., S. L. McGovern, B. Wei, and J. J. Irwin. 2002. 'Lead discovery using molecular docking', *Curr Opin Chem Biol*, 6: 439-46.
- Shpakov, A. O. 2011. 'Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling', *J Amino Acids*, 2011: 656051.
- Singla, A. K., A. Garg, and D. Aggarwal. 2002. 'Paclitaxel and its formulations', *Int J Pharm*, 235: 179-92.
- Smart, T. G., A. M. Hosie, and P. S. Miller. 2004. 'Zn<sup>2+</sup> ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity', *Neuroscientist*, 10: 432-42.
- Smrcka, A. V., D. M. Lehmann, and A. L. Dessal. 2008. 'G protein betagamma subunits as targets for small molecule therapeutic development', *Comb Chem High Throughput Screen*, 11: 382-95.
- Soderpalm, B., and M. Ericson. 2013. 'Neurocircuitry involved in the development of alcohol addiction: the dopamine system and its access points', *Curr Top Behav Neurosci*, 13: 127-61.

- Souroujon, M. C., and D. Mochly-Rosen. 1998. 'Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling', *Nat Biotechnol*, 16: 919-24.
- Spanagel, R. 2009. 'Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior', *Physiol Rev*, 89: 649-705.
- Stella, V. J., and Q. He. 2008. 'Cyclodextrins', *Toxicol Pathol*, 36: 30-42.
- Tsuruma, T., F. Hata, T. Torigoe, T. Furuhashi, S. Idenoue, T. Kurotaki, M. Yamamoto, A. Yagihashi, T. Ohmura, K. Yamaguchi, T. Katsuramaki, T. Yasoshima, K. Sasaki, Y. Mizushima, H. Minamida, H. Kimura, M. Akiyama, Y. Hirohashi, H. Asanuma, Y. Tamura, K. Shimozawa, N. Sato, and K. Hirata. 2004. 'Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer', *J Transl Med*, 2: 19.
- van Zundert, B., F. J. Alvarez, J. C. Tapia, H. H. Yeh, E. Diaz, and L. G. Aguayo. 2004. 'Developmental-dependent action of microtubule depolymerization on the function and structure of synaptic glycine receptor clusters in spinal neurons', *J Neurophysiol*, 91: 1036-49.
- Varga, C. M., T. J. Wickham, and D. A. Lauffenburger. 2000. 'Receptor-mediated targeting of gene delivery vectors: insights from molecular mechanisms for improved vehicle design', *Biotechnol Bioeng*, 70: 593-605.
- Vonghia, L., L. Leggio, A. Ferrulli, M. Bertini, G. Gasbarrini, and G. Addolorato. 2008. 'Acute alcohol intoxication', *Eur J Intern Med*, 19: 561-7.
- Wade, S. M., H. M. Dalman, S. Z. Yang, and R. R. Neubig. 1994. 'Multisite interactions of receptors and G proteins: enhanced potency of dimeric receptor peptides in modifying G protein function', *Mol Pharmacol*, 45: 1191-7.
- Wang, X., Y. Yuan, J. Li and, and C. Chen. 2011. 'Changes of cell membrane permeability induced by DMSO and ethanol in suspension culture of *Taxus cuspidata*', *Adv Mater Res*, 942: 236-38.
- Waters, N., S. Lagerkvist, L. Lofberg, M. Piercey, and A. Carlsson. 1993. 'The dopamine D3 receptor and autoreceptor preferring antagonists (+)-AJ76 and (+)-UH232; a microdialysis study', *Eur J Pharmacol*, 242: 151-63.

- Wells, C. A., K. M. Betke, C. W. Lindsley, and H. E. Hamm. 2012. 'Label-free detection of G protein-SNARE interactions and screening for small molecule modulators', *ACS Chem Neurosci*, 3: 69-78.
- White, J. H., A. Wise, M. J. Main, A. Green, N. J. Fraser, G. H. Disney, A. A. Barnes, P. Emson, S. M. Foord, and F. H. Marshall. 1998. 'Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor', *Nature*, 396: 679-82.
- Williams, K. L., A. P. Ferko, E. J. Barbieri, and G. J. DiGregorio. 1995. 'Glycine enhances the central depressant properties of ethanol in mice', *Pharmacol Biochem Behav*, 50: 199-205.
- Wise, R. A. 1987. 'The role of reward pathways in the development of drug dependence', *Pharmacol Ther*, 35: 227-63.
- Wise, R. A., and P. P. Rompre. 1989. 'Brain dopamine and reward', *Annu Rev Psychol*, 40: 191-225.
- Ye, J. 2000. 'Physiology and pharmacology of native glycine receptors in developing rat ventral tegmental area neurons', *Brain Res*, 862: 74-82.
- Ye, J. H., K. A. Sokol, and U. Bhavsar. 2009. 'Glycine receptors contribute to hypnosis induced by ethanol', *Alcohol Clin Exp Res*, 33: 1069-74.
- Yevenes, G. E., G. Moraga-Cid, A. Avila, L. Guzman, M. Figueroa, R. W. Peoples, and L. G. Aguayo. 2010. 'Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gbetagamma modulation', *J Biol Chem*, 285: 30203-13.
- Yevenes, G. E., G. Moraga-Cid, L. Guzman, S. Haeger, L. Oliveira, J. Olate, G. Schmalzing, and L. G. Aguayo. 2006. 'Molecular determinants for G protein betagamma modulation of ionotropic glycine receptors', *J Biol Chem*, 281: 39300-7.
- Yevenes, G. E., G. Moraga-Cid, R. W. Peoples, G. Schmalzing, and L. G. Aguayo. 2008. 'A selective G betagamma-linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 20523-8.

- Yevenes, G. E., R. W. Peoples, J. C. Tapia, J. Parodi, X. Soto, J. Olate, and L. G. Aguayo. 2003. 'Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits', *Nat Neurosci*, 6: 819-24.
- Yoshimura, K., T. Minami, M. Nozawa, and H. Uemura. 2013. 'Phase I clinical trial of human vascular endothelial growth factor receptor 1 peptide vaccines for patients with metastatic renal cell carcinoma', *Br J Cancer*, 108: 1260-6.
- Zheng, F., and S. W. Johnson. 2001. 'Glycine receptor-mediated inhibition of dopamine and non-dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro', *Brain Res*, 919: 313-7.
- Zinchuk, V., and O. Grossenbacher-Zinchuk. 2009. 'Recent advances in quantitative colocalization analysis: focus on neuroscience', *Prog Histochem Cytochem*, 44: 125-72.

