



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO COMPUTACIONAL DE VARIANTES  
DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub> UNIDO CON LIGANDOS  
SELECTOS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS  
FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**IVONNE ACOSTA BUITRÓN**

DIRIGIDA POR

**Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Estudio computacional de variantes del receptor  
GABAA unido con ligandos selectos para el diseño de  
nuevos fármacos antiepilépticos

**por**

Ivonne Acosta Buitrón

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQLIN-267716



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“ESTUDIO COMPUTACIONAL DE VARIANTES  
DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub> UNIDO CON LIGANDOS  
SELECTOS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS  
FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER TITULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

IVONNE ACOSTA BUITRÓN

DIRIGIDA POR

DR. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

Sinodales

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas  
Director

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote  
Sinodal

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Sinodal

Dr. Julio Lenin Ramírez Domínguez  
Suplente

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyo proporcionado al proyecto de Ciencia Básica A1-S-17090 (SEP-CONACYT-CB2017-2018) que hizo posible la adquisición del equipo utilizado en las simulaciones y análisis computacionales.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y la Facultad de química por brindar los espacios y los conocimientos durante la licenciatura. A las maestras y maestros por compartir su sabiduría, historias y consejos.

Al Dr. Antonio Romo por permitirme aprender en sus laboratorios desde temprana edad y por presentarme el maravilloso mundo de la investigación.

A mis padres y abuela, por enseñarme a soñar y no detenerme, que a pesar de que fue difícil estar tan lejos de ellos estos años, nunca faltaron sus palabras de apoyo y consejos. A mi hermano Lothar, eres mi mayor ejemplo de fortaleza en esta vida, me enseñaste que si se puede a pesar de lo que nos dicta la medicina y la estadística.

A mis amigas y amigos, que siempre estuvieron para escuchar mis miedos, enojos e inquietudes, y a todos aquellos que me ayudaron a cargar mi mochila cuando usaba bastón.

A mi neurólogo, el Dr. Mena, quien apostó a que algún día podré estar bien a pesar de las adversidades de mi salud.

A Carey, mi compañero incondicional en cada viaje, desvelo y descanso.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	7
1. ANTECEDENTES	9
1.1. Epilepsia	9
1.2. Ácido gama-aminobutírico y su receptor	11
1.3. Otros receptores a GABA	14
1.4. Actividades reportadas de las subunidades de los GABA <sub>A</sub> R	14
1.5. Farmacoterapia para la epilepsia	15
1.5.1. Nuevos fármacos para la epilepsia	16
1.6. Diseño de fármacos asistido por computadora	18
1.6.1. Modelado de proteínas por homología	19
1.6.2. Acoplamiento molecular (Docking)	21
1.6.3. Simulaciones de dinàmica molecular	22
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. General	26
3.2. Específicos	26
4. METODOLOGÍA	27
4.1. Modelado de las subunidades de los GABA <sub>A</sub> R	27

4.2.	Construcción de las variantes del receptor GABA <sub>A</sub> por alineamiento y relajación por simulaciones de dinámica molecular	27
4.3.	Identificación del sitio y forma de unión de los ligandos selectos por acoplamiento molecular	28
4.4.	Optimización de los complejos ligando-receptor por simulaciones de dinámica moelcular	29
4.5.	Cuantificación del efecto de la unión de los ligandos selectos a la estructura del receptor	29
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1.	Construcción de los modelos computacionales de cuatro variantes del receptor heteropentamérico GABA <sub>A</sub>	30
5.1.1.	Modelado de las subunidades de los GABA <sub>A</sub> R	30
5.1.2.	Construcción de las variantes del receptor GABA <sub>A</sub> por alineamiento y relajación por simulaciones de dinámica moelcular	32
5.2.	Identificación del sitio y forma de unión de los ligandos selectos por acoplamiento molecular	37
5.2.1.	Identificación del modo de unión de GABA y padsevonil por acoplamiento molecular	7
5.2.2.	Optimización de los complejos ligando-receptor por simulaciones de dinámica molecular	37
5.3.	Cuantificación del efecto de la unión de los ligandos selectos a la estructura del receptor	59
5.3.1.	Determinación de la apertura del canal iónico GABA <sub>A</sub> en presencia o ausencia de ligandos	59
5.4.	Análisis global	64
6.	CONCLUSIONES	67

7. REFERENCIAS

69

8. ANEXOS

74

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Mutaciones reportadas en genes que codifican para los GABA <sub>A</sub> R relacionados con la epilepsia y otras patologías	13
2	Residuos de membrana.	28
3	Coordenadas utilizadas para acoplamiento molecular.	28
4	Códigos ASL.	29
5	Resultados de I-TASSER de las subunidades construídas por homología.	30
6	Calidad de las subunidades en Molprobit. P	31
7	Calidad de los pentámeros en Molprobit previos a la simulación.	32
8	Cantidad de movimiento representativos de las variantes en sus dinámicas moleculares de 300ns.	34
9	Elección del clúster representativo de las variantes.	35
10	Calidad de las variantes en diferentes tiempos.	35
11	Alineación de las variantes a diferentes tiempos.	36
12	Resultados de acoplamiento molecular.	37
13	Cambios representativos de la variante $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con y sin ligandos.	40
14	Elección del clúster representativo del pentámero $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ .	42
15	Calidad del pentámero $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ a diferentes tiempos.	42
16	Movimientos representativos de la variante $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con y sin ligandos.	45
17	Elección del clúster representativo del pentámero $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ .	46
18	Calidad del pentámero $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ a diferentes tiempos.	47

19	Movimientos representativos de la variante $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con y sin ligandos.	49
20	Elección del clúster representativo del pentámero $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ .	51
21	Calidad del pentámero $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ a diferentes tiempos.	51
22	Movimientos representativos de la variante $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con y sin ligandos.	54
23	Elección del clúster representativo del pentámero $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ .	56
24	Calidad del pentámero $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ a diferentes tiempos.	56
25	Diferencias de áreas del análisis de apertura del poro a lo largo de la dinámica molecular de 100ns.	57
26	Áreas en los puntos máximos de apertura del poro a lo largo de la dinámica molecular de 100ns.	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Molécula del Ácido gama-aminobutírico.	11
2	Diagrama general del receptor GABA <sub>A</sub> .	18
3	RMSD de la dinámica molecular de 300ns de todas las variantes.	33
4	RMSF de la dinámica molecular de 300ns todas las variantes.	34
5	RMSD de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con y sin ligandos.	38
6	RMSF de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con y sin ligandos.	39
7	Diagrama de interacciones proteína-ligando de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con ligandos.	41
8	RMSD de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con y sin ligandos.	43
9	RMSF de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con y sin ligandos.	43
10	Diagrama de interacciones proteína-ligando de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con ligandos.	45
11	RMSD de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con y sin ligandos.	47
12	RMSF de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con y sin ligandos.	48
13	Diagrama de interacciones proteína-ligando de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con ligandos.	50
14	RMSD de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con y sin ligandos.	52

15	RMSF de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con y sin ligandos.	52
16	Diagrama de interacciones proteína-ligando de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con ligandos.	55
17	Análisis de áreas del pentámero $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ en ausencia y presencia de ligandos.	58
18	Análisis de áreas del pentámero $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ en ausencia y presencia de ligandos.	59
19	Análisis de áreas del pentámero $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ en ausencia y presencia de ligandos.	61
20	Análisis de áreas del pentámero $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ en ausencia y presencia de ligandos.	62

## RESUMEN

La epilepsia es un trastorno del sistema nervioso central caracterizado por una actividad neuronal anormal excesiva o sincrónica en el cerebro. Se caracteriza por convulsiones recurrentes, episodios breves de movimiento involuntario, que pueden involucrar a una parte o todo el cuerpo. Afecta a más de 50 millones de personas alrededor del mundo; en México se reportó dentro de las diez causas de muerte en el año 2020. Puede clasificarse de acuerdo con el tipo de crisis en focal, generalizada y desconocida; o de acuerdo con su etiología en genética, estructural, metabólica, infecciosa, inmunológica, y desconocida. Se ha encontrado que un desequilibrio entre la excitación y la inhibición inducida por una señalización GABAérgica alterada puede desencadenar varias formas de epilepsia. El receptor a GABA es uno de los blancos más significantes para el tratamiento de desórdenes neuropsiquiátricos, como la epilepsia. Una estrategia útil para abordar el entendimiento de este trastorno y sus blancos es el uso de herramientas computacionales que permitan el entendimiento del funcionamiento de receptores de GABA<sub>A</sub>R para contribuir al análisis de su activación, para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas para el tratamiento de epilepsia. En este proyecto se construyeron modelos computacionales de los subtipos de receptores a GABA relevantes en esta patología, como los son  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  y  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ , mediante modelado por homología y alineación de las subunidades, posteriormente se relajaron los modelos mediante dinámica molecular. Con estos modelos, se identificaron el sitio y forma de unión de los ligandos selectos, GABA y padsevoniil, por acoplamiento molecular, y se optimizaron los complejos ligando-receptor para observar cambios conformacionales en el receptor por simulaciones de dinámica molecular. Se encontró que cada variante se comporta de manera un poco diferente a pesar de ser una misma familia de receptores. Por otro lado, observamos el comportamiento del poro con y sin ligandos, donde, en presencia de los ligandos seleccionados, se tendió a un comportamiento de apertura, lo cual era de esperarse según el comportamiento farmacológico de los ligandos estudiados.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Epilepsia**

Los trastornos del neurodesarrollo, incluidos el trastorno del espectro autista, la discapacidad intelectual y la epilepsia, son las consecuencias de una alteración del desarrollo del sistema nervioso central (SNC) que se presenta clínicamente como alteraciones en el nivel personal, social, académico, o funcionamiento ocupacional (Braat y Frank-Kooy, 2015). La epilepsia es un trastorno cerebral no transmisible crónico que se caracteriza por convulsiones recurrentes, que son episodios breves de movimiento involuntario, que puede involucrar a una parte o todo el cuerpo (OMS, 2020). Se debe a una actividad neuronal anormal excesiva o sincrónica en el cerebro (Sucher y Carles, 2015).

La Organización Mundial de la Salud estima que la epilepsia afecta a más de 50 millones de personas alrededor del mundo. De ellos, 80% de los pacientes viven en países de ingresos bajos, donde cada año se diagnostican hasta 139 de cada 100 mil personas. La proporción estimada de la población general con epilepsia activa (ataques continuos o necesidad de tratamiento) oscila entre 4-10 por cada 1000 personas (OMS, 2019). Se estima que hasta el 70% de las personas con epilepsia podrían vivir sin crisis epilépticas si tuvieran acceso a tratamientos anticonvulsivos adecuados (OMS, 2020).

La prevalencia a lo largo de la vida, en América Latina y el Caribe, tiene una media de 17.8 por cada 1000 habitantes. No hay diferencias significativas de acuerdo con el sexo. Las tasas de mortalidad son más altas en las personas con epilepsia que en la población en general, pues anualmente va de 1 a 8 por cada 100,000 habitantes. El índice de mortalidad por epilepsia en América Latina y el Caribe es de 1.04 por cada 100,000 habitantes, superior al de Estados Unidos y Canadá, que es de 0.50 por cada 100,000 habitantes (OPS, 2018). En México, la epilepsia se encuentra dentro de las diez principales causas de muerte de acuerdo con las estadísticas del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática del año 2020 (INEGI, 2021).

De acuerdo a la Liga Internacional Contra la Epilepsia (*International League Against Epilepsy*, ILAE) (Riney y col., 2017), la epilepsia es una enfermedad del cerebro definida por cualquiera de las siguientes condiciones: al menos dos convulsiones no provocadas que ocurren con más de 24 horas de diferencia, una convulsión no provocada y una probabilidad de nuevas convulsiones similar al riesgo de ocurrencia general (60%) después de dos convulsiones no provocadas, y por último, convulsiones que ocurren como síntomas de un síndrome de epilepsia conocido. La ILAE establece que los síndromes de epilepsia a una edad variable pueden clasificarse en los siguientes grupos:

- Síndrome de epilepsia generalizado, con posible etiología poligénica: epilepsias generalizadas idiopáticas (epilepsia de ausencia juvenil, epilepsia mioclónica juvenil y epilepsia con convulsiones tónico-clónicas generalizadas solas).
- Síndrome de epilepsia focal con etiología genética, estructurales o genético-estructurales: epilepsia hipermotora relacionada con el sueño, epilepsia focal familiar con focos variables, epilepsia con características auditivas.
- Síndrome combinado de epilepsia generalizada y focal con etiología poligénica: epilepsia con convulsiones inducidas por la lectura.
- Encefalopatías epilépticas y/o del desarrollo: epilepsia mioclónica progresiva.

De igual forma puede clasificarse según su etiología como: genética estructural, metabólica, infecciosa, inmunológica, y desconocida; o según el tipo de crisis en generalizadas, focales y desconocidas (OPS, 2018). La epilepsia generalizada se origina en un solo punto del cerebro, pero rápidamente se involucran redes distribuidas bilateralmente en el SNC, que pueden incluir estructuras corticales y subcorticales, pero no necesariamente se ve implicada toda la corteza. Por otro lado, las convulsiones epilépticas focales se originan dentro de las redes de un solo hemisferio y pueden estar localizadas de manera discreta o distribuidas ampliamente, que de igual forma puede originarse en estructuras subcorticales

(Sucher y Carles, 2015). Un desequilibrio entre la excitación y la inhibición inducida por una señalización GABAérgica alterada puede desencadenar varias formas de epilepsia. Asimismo, el receptor a GABA es uno de los blancos más significantes para el tratamiento de desórdenes neuropsiquiátricos como epilepsia, insomnio, ansiedad, entre otras (Ghit y col., 2021).

## 1.2. Ácido gama-aminobutírico y su receptor

El ácido gama-aminobutírico (GABA) (figura 1) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto, modula el balance inhibitorio/excitatorio necesario para la función del propio cerebro. GABA actúa principalmente en la activación de la rápida hiperpolarización celular mediante los receptores a GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R), un receptor del tipo heteropentamérico ionotrópico. Cuando GABA se une a su receptor, el canal se abre y iones cloruro difunden hacia dentro de la célula, hiperpolarizando así la neurona post-sináptica (Wu y Sun, 2015). Se estima que el 20-30% de las neuronas del sistema nervioso central son GABAérgicas (Rudolph y Knoflach, 2011).

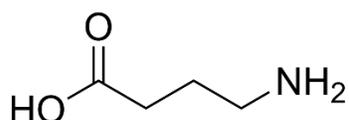


Figura 1. Molécula del Ácido gama-aminobutírico.

El complejo heteropentamérico de GABA<sub>A</sub>R está formado por la combinación de 19 subunidades:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  y  $\rho_{1-3}$ . Generalmente, se reconoce que la forma canónica del receptor está conformada por dos subunidades  $\alpha$ , dos subunidades  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$  (Szodorai y col., 2018). Las subunidades individuales, están compuestas por alrededor de 450 residuos, y tienen la característica común de contar con una estructura que consta de un dominio extracelular amino-terminal (NH<sub>2</sub>-T), un dominio transmembrana (TM) compuesto por cuatro regiones  $\alpha$ -hélice (M1-4) y un extremo carboxilo-terminal (COOH-T)

que apenas se extruye hacia el citosol (Solomon y col, 2019). La región M2 de cada una de las 5 subunidades forman el poro del canaliónico, y cada región M2 está conectada por un pequeño bucle intracelular entre M1-M2 y un dominio intracelular entre M3-M4 (Rudolph y Knoflach, 2011; Riney y col., 2017). La unión de GABA a su receptor da como resultado una perturbación local de la estructura que se propaga a través del dominio extracelular provocando un cambio de conformación. Este último resulta en cambios en el dominio transmembrana que conducen al flujo de iones a través del poro, de una manera similar a la descrita para el receptor de acetilcolina (Solomon y col., 2019). La combinación más común del receptor es el subtipo  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , pero existen múltiples combinaciones más, que se sitúan en diferentes regiones del cerebro, como  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  y  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  (Rudolph y Knoflach, 2011; Chuang y Reddy, 2018; Bhagat y col., 2020).

La localización de los receptores varía de acuerdo con su expresión en el sistema nervioso central. Por ejemplo, los  $GABA_A$ R en los sitios postsinápticos están compuestos normalmente por las subunidades  $\alpha_{1-3}$ ,  $\beta_{1-3}$ , y  $\gamma_2$ , donde GABA realiza una inhibición fásica, es decir, puede unirse y promover la entrada de iones cloruro, aumentando así la conductancia aniónica por milisegundos, conduciendo a la hiperpolarización de una membrana despolarizada (Ghit y col., 2021). Por otro lado, los  $GABA_A$ R compuestos por las subunidades  $\alpha_{4-6}$ ,  $\beta_{2/3}$ , y  $\delta$  pueden localizarse en sitios extrasinápticos donde bajas concentraciones de GABA pueden abrir los receptores por un largo periodo de tiempo, lo cual se conoce como inhibición tónica (Maguire y col., 2005).

Se han reportado sitios de unión en subtipos particulares de los receptores  $GABA_A$ , que determinan las distintas huellas farmacológicas de los receptores. El sitio de unión de GABA se conoce como el sitio activo o sitio ortostérico, y se encuentra en la interfaz  $\alpha$ - $\beta$  cercano al extremo amino terminal, donde se unen los agonistas y antagonistas ortostéricos, resultando en un incremento o decremento en la conductancia del ion cloruro, respectivamente (Ghit y col., 2021). Por otro lado, los moduladores alostéricos pueden unirse en cualquier otro lado del receptor y ejercen su efecto causando cambios conformacionales, ya sea

positivamente (como barbitúricos, benzodiazepinas, fármacos no-benzodiazepínicos, alcohol, etomidato, glutetimida, y anestésicos), o negativamente (como el sulfato de pregnenolona y zinc) (Bhagat y col., 2020; Ghit y col., 2021).

Los receptores funcionales GABA<sub>A</sub> se forman típicamente a partir de 3 de 19 productos génicos diferentes codificados por GABRA1–GABRA6 ( $\alpha_{1-6}$ ), GABRB1–GABRB3 ( $\beta_{1-3}$ ), GABRG1–GABRG3 ( $\gamma_{1-3}$ ), GABRR1–GABRR3 ( $\rho_{1-3}$ ), GABRD ( $\delta$ ), GABRE ( $\epsilon$ ), GABRP ( $\pi$ ), y GABRQ ( $\theta$ ) (Ghit y col., 2021). Dichos genes son de interés en desórdenes de alteración de la excitabilidad neuronal como la epilepsia (Butler y col., 2018). Se han reportado mutaciones en dichos genes relacionados con distintos síndromes de epilepsia u otras patologías, tal como se enlista en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Mutaciones reportadas en genes que codifican para los GABA<sub>A</sub>R relacionados con la epilepsia y otras patologías (Butler y col., 2018, Maljevic, 2019).

Gen mutado	Patología relacionada
GABRA1	Epilepsia mioclónica juvenil hereditaria autosómica dominante, y encefalopatías epilépticas esporádicas como síndrome de Dravet y síndrome de Ohtahara.
GABRB2	Epilepsia genética generalizada, encefalopatías epilépticas y de desarrollo.
GABRA2 y 5	Epilepsia grave de inicio temprano, discapacidad intelectual, hipotonía y microencefalia.
GABRA3	Retraso en el desarrollo o discapacidad intelectual, paladar hendido y baja estatura.
GABRB1	Espasmos infantiles.
GABRB3	Convulsiones febriles, epilepsia generalizada con convulsiones febriles, epilepsia mioclónica-atónica, síndrome de Dravet, epilepsia focalizada y encefalopatía epiléptica de inicio temprano.
GABRG2	Epilepsia generalizada con convulsiones febriles, convulsiones febriles, crisis de ausencia y encefalopatías epilépticas.
GABRD	Susceptibilidad a epilepsia generalizada.

La composición de los subtipos de GABA<sub>A</sub>R juega un papel importante en la

determinación de las propiedades intrínsecas de cada canal, incluida su afinidad por GABA, cinética, conductancia, modulación alostérica, probabilidad de apertura del canal, interacción con proteínas moduladoras y distribución subcelular (Jing-Qiong K., 2017). Bajos niveles de GABA en el cerebro se han asociado con algunas enfermedades como ansiedad, dolor, manías, depresión y epilepsia (Bormann, 2000). Interrupciones en la neurotransmisión dependiente de GABA conduce a efectos inhibidores insuficientes en todo el cerebro, lo cual contribuye a la patogenia de la epilepsia, trastornos del neurodesarrollo, depresión, ansiedad, esquizofrenia, entre otras (Lorenz-Guertin y col., 2018). Las características de los ligandos que contribuyen a la activación del receptor se utilizan habitualmente como ansiolíticos, anticonvulsivos, sedantes y relajantes musculares (Rudolph y Knoflach, 2011).

### **1.3. Otros receptores a GABA.**

Los receptores a GABA en los mamíferos se clasifican en dos grupos, receptores ionotrópicos ( $GABA_A$  y  $GABA_C$ ) y metabotrópicos acoplados a proteínas G ( $GABA_B$ ). Estructuralmente, los receptores  $GABA_B$  se componen de dos subunidades heterodiméricas: GB1 y GB2. La primera se une a GABA, pero no es capaz de activar la proteína G, y la segunda si puede activar a la proteína G, sin unirse directamente a GABA. Su activación está acoplada a canales de potasio y/o calcio a través de la proteína G. Funcionalmente, este receptor media la inhibición sináptica lenta y está implicado en muchos tipos de nocicepción, deterioro cognitivo, epilepsia, espasticidad y adicción a fármacos (Wu y Sun, 2015; Bhagat, 2020).

El receptor  $GABA_C$  es un segundo tipo de canal ionotrópico que ahora se considera parte de las isoformas del receptor  $GABA_A$  (Ghit y col., 2021) que se ha identificado en el sistema nervioso central y en la retina de los vertebrados. Su estructura homopentamérica está constituida por tres subunidades  $\rho$  (Wu y Sun, 2015).

#### **1.4. Actividades reportadas de las subunidades de los GABA<sub>A</sub>R.**

La modulación de la subunidad  $\alpha_1$  está relacionada con efectos anticonvulsivos, sedativos, ansiolíticos, hipnóticos y amnésicos al interactuar con benzodiazepinas (Braat y Frank, 2015; Calixto, 2016; Chen y col., 2019; Solomon y col., 2019; Bhagat y col., 2020), y su agonismo inverso induce convulsiones (Bhagat y col., 2020).

El agonismo de las subunidades  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  está relacionado con efectos ansiolíticos sin sedación, así como su agonismo inverso produce efectos ansiogénicos (Braat y Frank, 2015; Bhagat y col., 2019; Smart y Stephenson, 2019; Solomon y col., 2019). Se sabe también que  $\alpha_2$  contribuye más que  $\alpha_3$  para la acción anticonvulsivante de las benzodiazepinas (Cheng y col., 2018).

La subunidad  $\alpha_5$  juega un rol menor en efectos anticonvulsivantes, pero su agonismo inverso mejora la memoria, cognitividad y vigilia, sin producir ansiedad o efectos proconvulsivantes en animales (Braat y Frank, 2015; Cheng y col., 2018; Chen y col., 2019). También está asociado a amnesia cuando interactúa con benzodiazepinas (Smart y Stephenson, 2019). El agonismo parcial de  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_5$  produce efectos ansiolíticos sin sedación, y el mínimo agonismo de  $\alpha_1$  produce sedación en humanos (Cheng y col., 2018). El agonismo de la subunidad  $\gamma_2$  con  $\alpha_{1,2,3,5}$  y benzodiazepinas está relacionado con efectos sedativos/hipnóticos, anticonvulsivantes, miorelajantes y ansiolíticos (Lorenz-Guertin y col., 2018).

#### **1.5. Farmacoterapia para la epilepsia.**

En 1912, Hauptmann introdujo el fenobarbital como el primer fármaco sintético antiepiléptico, y se consideró como superior a los anestésicos bromados que se usaban desde 1850 y la fenitoína desde 1939 (Sucher y Carles, 2015). Posteriormente, en 1955, el químico Leo Sternbach descubrió a las benzodiazepinas, agonistas del receptor a GABA, y se creía que eran un prometedor reemplazo para los barbitúricos, pues estos últimos causaban muchos efectos adversos, como gran incidencia de abuso, dependencia y

sobredosis. Las benzodiazepinas llegaron al mercado en la década de los 1960, y a pesar de tener un menor índice de toxicidad y abuso, su consumo repetido también causaba dependencia, pero esto no se reconoció hasta la década de los 1980 (Bhagat y col., 2020).

La segunda generación de fármacos antiepilépticos surge también en la década de los sesenta con la introducción del valproato, que aumenta los niveles de GABA, y la carbamazepina que reduce la liberación de glutamato (Jing-Qiong, 2017). En los años noventa llega la tercera generación, la cual no resultó más eficaz que sus antecesores, pero parecía tener menos interacciones farmacocinéticas con otros fármacos y presentaba menos efectos adversos, como toxicidad y abuso (Sucher y Carles, 2015).

La elección del medicamento anticonvulsivo debe basarse en distintos factores como el tipo de epilepsia, comorbilidades, el uso de otros medicamentos, el estilo de vida, la preferencia y tolerancia a la medicación del paciente, así como su efectividad (Liu y col., 2017). Los efectos secundarios del uso de anticonvulsivos pueden incluir aturdimiento, visión doble, mareos, náuseas, marcha inestable, depresión, irritabilidad, hiperactividad, sarpullido, ataxia, constipación, dolor de cabeza, somnolencia, vómito, agresión, insomnio, anorexia, problemas en el comportamiento, agitación, vértigo, sedación, confusión, alucinaciones, letargo, alteración del juicio (Liu y col, 2017; Kaeberle, 2018).

Dentro de los medicamentos más comúnmente prescritos se encuentran: la carbamazepina, fenitoína, ácido valpróico, etosuximida, fenobarbital, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, topiramato, zonisamida, tiagabina, felbamato, GABA<sub>A</sub> y preGABA<sub>A</sub> (Meldrum y Rogawski, 2007; Kaeberle, 2018).

La comprensión del papel de GABA en la década de los setenta como neurotransmisor inhibitor en el cerebro, llevó al diseño de compuestos anticonvulsivos que modifican la disposición de GABA para mejorar la señalización GABAérgica o mediante la modulación de los GABA<sub>A</sub>R para aumentar su actividad inhibitoria (Meldrum y Rogawski, 2007; Jing-Kiong, 2017).

### 1.5.1. Nuevos fármacos para epilepsia

Los antiepilépticos aprobados en la última década han demostrado ser seguros y tener un buen perfil farmacogenético. Desafortunadamente 1/3 de los pacientes con epilepsia continúan experimentando convulsiones mal controladas a pesar de su tratamiento. La politerapia es una estrategia de tratamiento para pacientes con epilepsia resistente a fármacos (Leclercq y col., 2019).

Levetiracetam es el primer fármaco antiepiléptico que ejerce su actividad terapéutica dirigiéndose a elementos de la maquinaria de liberación sináptica, mediante la unión de la proteína de la vesícula sináptica 2A (SV2A). Esta y sus otras isoformas (SV2B y SV2C) son glicoproteínas integrales de membrana que están presentes en vesículas secretoras de neuronas y células endócrinas. Su función precisa aún es desconocida, pero dada su presencia en vesículas excretoras, lo más probable es que desempeñen un papel en la exocitosis de vesículas (Wood y col., 2020). Se ha observado que en la coadministración de levetiracetam con agentes que actúan sobre los receptores a GABA<sub>A</sub> conduce a una mayor protección contra las convulsiones sin efectos perjudiciales sobre la seguridad, además de potencializar el efecto de las benzodiazepinas. En consecuencia, se plantea la hipótesis de que una sola molécula que actúe simultáneamente sobre objetivos pre y postsinápticos, podría traducirse a una mejor eficacia clínica en el tratamiento de pacientes con epilepsia, especialmente en aquellos resistentes a medicamentos (Niespodziany y col., 2020).

Padsevonil es el primer fármaco antiepiléptico diseñado racionalmente que inhibe la actividad convulsiva presinápticamente con alta afinidad sobre SV2A y postsinápticamente mediante la inhibición GABAérgica, específicamente en el sitio de benzodiazepinas, pero con menor afinidad. Se ha demostrado que padsevonil se une a las tres isoformas de SV2 (SV2A pKi=8.5, SV2B pKi=7.4, SV2C pKi=8.5) y que tiene una afinidad 100-2000 veces mayor que levetiracetam y brivaracetam con SV2A (pKi=8.5 vs 6.6 y 5.2, respectivamente) (Bialer y col., 2018). Post-sinápticamente, se une a los receptores a GABA<sub>A</sub> como modulador

alostérico positivo, con baja-moderada afinidad ( $pK_i$  6.4) en el sitio sensible a benzodiazepinas, mostrando un perfil de agonista parcial. La ventaja de que tenga este perfil es que se disminuyen los efectos adversos sobre el sistema nervioso central y respiratorio, desarrollo de tolerancia y se disminuye el potencial abuso típico por el uso de benzodiazepinas que son agonistas puros (Leclerq y col., 2019). La actividad de padsevonil con  $GABA_A$ R se determinó en la variante  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  y se observó que no produce corrientes de  $Cl^-$  en ausencia de GABA, confirmando que modula al receptor en un sitio alostérico. Se une al sitio de benzodiazepinas (figura 2) como agonista parcial en comparación de zolpidem (40% y 100% respectivamente). Además, se une a todas las variantes sensibles a benzodiazepinas, pero tiene más potencia en  $\alpha_1$  y  $\alpha_5$ , que en  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  (Niespodziany y col., 2020). A pesar de que la estrategia de desarrollar un fármaco como padsevonil es novedosa, éste no ha salido al mercado por razones comerciales al no demostrar ser superior, desde el punto de vista clínico, a brivaracetam (Contreras-García y col., 2022).

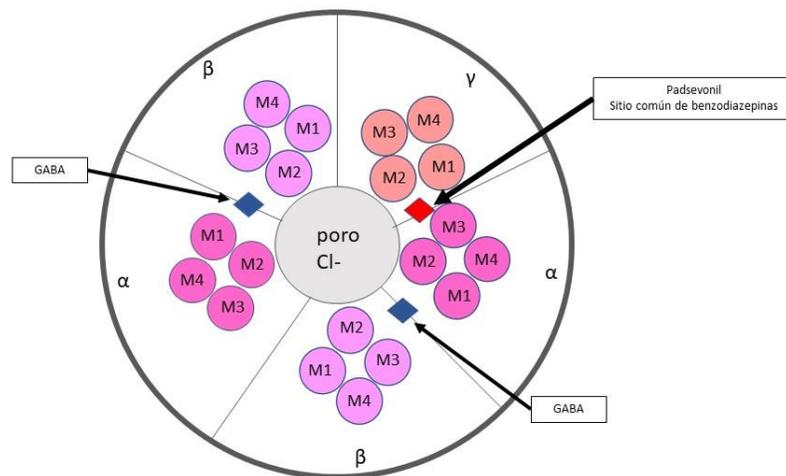


Figura 2. Diagrama general del receptor  $GABA_A$ . En la imagen se muestra la estructura general del receptor  $GABA_A$ , donde podemos apreciar que se forma a

partir de cinco subunidades con cuatro regiones álfa-hélice (M) cada uno. La región M2 de cada una de las 5 subunidades forman el poro del canal iónico, y cada región M2 está conectada por un pequeño bucle intracelular entre M1-M2 y un dominio intracelular entre M3-M4 (Rudolph y Knoflach, 2011; Riney y col., 2017)

### **1.6. Diseño de fármacos asistido por computadora.**

El aprendizaje automático proporciona un marco teórico para el descubrimiento y lapriorización de compuestos bioactivos con efectos farmacológicos deseados y su optimización. Entre sus muchos enfoques en la informática molecular, los métodos quimiocéntricos han encontrado una aplicación generalizada, que se basa en tres pasos: primero, la selección del conjunto de descriptores específicos del problema que se cree que capturan las propiedades esenciales de las moléculas involucradas;luego se utiliza un esquema métrico o de puntuación para comparar las moléculas codificadas entre sí; por último, se emplea un algoritmo de aprendizaje para identificar las características que pueden servir para distinguir cualitativa o cuantitativamente los compuestos activos o inactivos. Una razón de éxito en la aplicación farmacológica se debe a que una parte importante de la complejidad inherente de las interacciones moleculares se ha empleado en los descriptores usados como patrones para el entrenamiento de modelos, lo que permite que las arquitecturas de aprendizaje automático aborden dicho problema (Gawehn y col., 2016).

En años recientes, la bioinformática y farmacogenómica han creado un impacto positivo en el descubrimiento de fármacos. El entendimiento detallado de las interacciones entre pequeñas moléculas y proteínas construyen la base de una estrategia racional de diseño de fármacos (de Ruyck y col., 2016). Por lo tanto, el enfoque computacional se ha convertido en una característica primordial para analizar de manera integrada todo el conocimiento disponible. Deben tomarse en cuenta algunos puntos al diseñar un fármaco como, interacciones de tipo puente de hidrógeno, cambios conformacionales, factores ambientales, distribución de átomos en la molécula, entre otros (Sneha y Priya, 2016).

### 1.6.1. Modelado de proteínas por homología.

En general, el modelado por homología consiste en la selección de uno o más templados de una base de datos, su alineamiento con la secuencia blanco de estructura tridimensional desconocida, y su refinamiento de la geometría de sus cadenas laterales y regiones de baja identidad de secuencia (Floudas y col., 2006).

La mayoría de las proteínas no tienen su estructura reportada la base de datos pública *Protein Data Bank* (PDB), además de que existe una gran brecha entre las estructuras resueltas por resonancia magnética nuclear, cristalografía de rayos X y las secuencias de proteínas en las bases de datos. Para minimizar dicha brecha, las técnicas de modelado por homología muestran un enfoque positivo, buscando secuencias de plantilla para la proteína donde no hay estructuras 3D disponibles en PDB (Sneha y Priya, 2016).

Existen distintos métodos para el modelado por homología de proteínas, uno de ellos es el modelado comparativo, donde se produce la estructura de la proteína comparando su secuencia de aminoácidos con secuencias para las que ya se conoce la estructura tridimensional nativa. Este método se basa en el principio de que secuencias similares presuponen estructuras similares. La precisión de las predicciones mediante modelos comparativos depende en gran medida del grado de similitud de secuencia. Si ambas secuencias comparten más del 50% de identidad, las predicciones suelen ser de alta calidad. Para un 30-50% de identidad de secuencia, se puede esperar que más del 80% de los átomos de carbono estarán dentro de 3.5 Å de sus posiciones reales, mientras que para menos del 30% de identidad de secuencia es probable que la predicción contenga errores significativos. Algunos algoritmos se han establecido para el primer paso (la identificación de la plantilla) como BLAST, y SPI-BLAST para el refinamiento, los cuales sirven como puntos de referencia a cualquier nuevo enfoque de modelado de proteínas (Floudas y col., 2006). I- TASSER fue diseñado originalmente para el modelado de estructuras de proteínas mediante simulaciones

iterativas de ensamblaje de subprocesos. Para el 2015 se amplió para la anotación de funciones basadas en estructura al hacer coincidir las predicciones de estructura con plantillas funcionales conocidas (Yang y col., 2015). El servidor I-TASSER es una plataforma integrada para la predicción automatizada de la estructura y función de la proteína basada en el paradigma de secuencias similares estructuras y funciones similares. A partir de una secuencia de aminoácidos, genera primero modelos atómicos tridimensionales a partir de múltiples alineaciones de subprocesos y simulaciones de ensamblaje estructural iterativo. La función de la proteína se infiere luego haciendo coincidir estructuralmente los modelos 3D con otras proteínas conocidas (Roy, 2005).

### **1.6.2. Acoplamiento molecular (*Docking*).**

El desarrollo de métodos de cristalografía de alto rendimiento y resonancia magnética nuclear han contribuido a la adquisición de las estructuras atómicas de las proteínas y complejos proteína-ligando con un mayor nivel de detalle. Cuando la estructura tridimensional de la diana existe, una técnica de uso frecuente para el diseño de moléculas es el diseño de fármacos basado en la estructura.

Una comprensión detallada de los mecanismos enzimáticos a nivel atómico y electrónico es crucial en la investigación biomédica. A menudo se usan enfoques combinados en los que los cálculos normalmente utilizan un campo de fuerza de mecánica molecular para el sistema en su conjunto y aplican un tratamiento *ab initio* (química cuántica) en el sitio de interés. Con este método se pueden abordar diferentes aspectos de los sistemas biológicos estudiados, como sus propiedades electrónicas, sitios de interacción o cambios conformacionales que ocurren en los sitios activos de las proteínas (de Ruyck y col., 2016).

El acoplamiento molecular se define como la predicción del modo y la afinidad teórica de unión entre un ligando y su receptor (Xu y col., 2018). Calcula la afinidad teórica del fármaco con la proteína (*score*), lo cual podría conotar la especificidad de dicha molécula. El acoplamiento suele ser un proceso de varios

pasos en el que cada paso introduce uno o más grados adicionales de complejidad para comprender las afinidades de enlace (Sneha y Priya, 2016). Existe una gran variedad de paquetes de software disponibles para realizar el acoplamiento proteína-ligando, algunos de los más populares son DOCK, AutoDock, LUDI, FlexX, GOLD, Glide, AutoDock Vina, entre otros (Grinter y Zou, 2014).

Las funciones de evaluación (*docking score functions*) pueden agruparse en tres clases, de acuerdo en cómo se derivan en: basado en su campo de fuerza, enfoques empíricos, y basadas en potenciales estadísticos. La primera intenta modelar exhaustivamente los muchos tipos de interacciones involucradas en la unión proteína-ligando, utilizando formas y parámetros funcionales basados en la física que se derivan de experimentos o simulaciones de mecánica cuántica. Las funciones basadas en enfoques empíricos utilizan métodos de regresión o aprendizaje automático para asociar la predicción deseada, generalmente la afinidad de unión de los complejos, con características generales de esos complejos. Y, por último, las funciones basadas en potenciales estadísticos asignan términos similares a la energía a características estructurales de las interacciones proteína- ligando en función de la frecuencia con la que esas características ocurren en un conjunto de entrenamiento de complejos proteína-ligando (Grinter y Zou, 2014; Xu y col., 2018).

### **1.6.3. Simulaciones de dinámica molecular.**

Las proteínas tienen la habilidad de cambiar su conformación en respuesta a factores externos como temperatura, pH, cargas, concentración de iones, fosforilación o unión a ligandos. Comprender las interacciones de unión dentro y entre las moléculas ha demostrado ser una parte importante en el diseño de fármacos. Además, el estudio de patrones de interacción y unión a nivel molecular del fármaco puede ayudarnos a entender su mecanismo de acción. Para analizar los movimientos de un fármaco junto con el objetivo, el enfoque de dinámica molecular elucidada el movimiento detallado de todos los átomos presentes durante

un periodo de tiempo definido y bajo condiciones constantes de presión, volumen y temperatura (Mitsutake y col., 2013; Dämgen y Biggin, 2019).

El análisis de las funciones de la energía potencial (campos de fuerza) aumenta el conocimiento sobre la proteína. Un campo de fuerza es una expresión que describe matemáticamente la dependencia de energía del sistema sobre todas las coordenadas de sus partículas. Existen muchos campos de fuerza disponibles, pero los más utilizados son CHARMM, AMBER, GROMOS, OPLS y COMPASS.

El modelo de solvatación juega un rol significativo en describir la estabilidad electrostática del ambiente acuoso. En un sistema biológico puede haber una gran variación en el sistema de solventes que maneja ciertas reacciones para mantener la capacidad de sustentabilidad de todo el sistema. La interacción del fármaco difiere con el disolvente del sistema, ya que hay cambios más grandes para que la molécula produzca interacciones fuertes con el objetivo en presencia de moléculas de agua. Es por ello que la solvatación para dinámica molecular debe ser diseñada de acuerdo con los requerimientos del sistema.

Por otro lado, la simulación a diferentes temperaturas puede brindar una descripción general del comportamiento de la proteína con respecto a esta variante. De manera similar, los gradientes de presión son otro conjunto de parámetros para comprender el movimiento de las proteínas. Las diferentes regiones de proteínas reaccionan de manera diferente al gradiente de presión. Bajo presión, las interacciones hidrofóbicas tienden a alterarse afectando el plegamiento de proteínas. Por tanto, tanto la temperatura como la presión tienen un impacto directo en el mecanismo de plegado de proteínas (Sneha y Priya, 2016).

Los cambios en la energía libre proporcionan información valiosa para el reconocimiento molecular, incluida la termodinámica y la cinética de unión de ligando-receptor. El *umbrella sampling* es un método de cálculo de energía libre ampliamente utilizado durante mucho tiempo para explorar el proceso de disociación de los sistemas ligando-receptor y calcular la energía libre de enlace

(You y col., 2019).

Las técnicas computacionales mencionadas anteriormente son ampliamente utilizadas en el desarrollo de nuevas moléculas con posible actividad biológica, pues permiten disminuir costos y tiempo de producción; sin embargo, no se descarta la posibilidad de fracaso, pues al final de cuentas son aproximaciones obtenidas mediante cálculos, la comprobación experimental siempre debe acompañar a los métodos computacionales, pues “la rata siempre tiene la razón” (Aguilera-Durán, 2021).

Debido a la naturaleza multifactorial de la epilepsia, la farmacoterapia actual es insuficiente debido a la tolerancia y la gran lista de efectos secundarios que sufren los pacientes con el uso prolongado de fármacos antiepilépticos. Por ello, el entendimiento del funcionamiento de receptores de GABA<sub>A</sub>R, mediante técnicas computacionales, como modelado por homología, acoplamiento y dinámica moleculares pueden contribuir al análisis de su activación para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas para el tratamiento de epilepsia.

## **2. HIPÓTESIS**

El modelado por homología del receptor GABA<sub>A</sub> y sus simulaciones por dinámica molecular nos dará modelos fiables de las variantes, y la unión de estos con ligandos causarán cambios conformacionales relacionados al estado activo/inactivo del receptor, observables por técnicas computacionales.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. General**

Observar, mediante técnicas computacionales, los cambios conformacionales del receptor GABA<sub>A</sub> inducidos por la unión de ligandos selectos.

#### **3.2. Específicos**

- Construir los modelos computacionales de cuatro variantes delreceptor heteropentamérico GABA<sub>A</sub>.
- Identificar el sitio y forma de unión de los ligandos selectos.
- Cuantificar el efecto de la unión de los ligandos selectos a la estructura del receptor.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Modelado de las subunidades de los GABA<sub>A</sub>R.

La secuencia primaria de las subunidades  $\alpha_{1, 2, 3}$ ,  $\beta_{2, 3}$ , y  $\gamma_2$  se obtuvieron de la base de datos UniProt (códigos P14867, P47869, P34903, P47870, P28472, P18507, respectivamente). Las estructuras tridimensionales de subunidades modelo se obtuvieron de la base de datos *Protein Data Bank* (código PDB: 6D6TB y 4COF, respectivamente). La secuencia de aminoácidos se cargó en el servidor web I-TASSER para construir el modelo por homología de las subunidades  $\alpha_{2, 3}$ , y  $\beta_3$ , usando los parámetros predeterminados por el servidor, mismo que calcula los modelos con la mejor identidad de secuencia encontrada por el servidor BLAST (código PDB: 6HUG).

### 4.2. Construcción de las variantes del receptor GABA<sub>A</sub> por alineamiento y relajación por simulaciones de dinámica molecular.

Una vez que se obtuvieron los modelos de las subunidades requeridas, estas se alinearon con el PDB 6CDU, la cristalografía correspondiente al receptor GABA<sub>A</sub>R  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , para construir los subtipos del receptor por el alineamiento proteína-proteína de las subunidades construidas en I-TASSER con las presentes en esta cristalografía. Este alineamiento y construcción del modelo pentamérico se realizó en el software Schrödinger-Maestro (Bowers y col., 2006; Schrödinger, 2019).

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron en el módulo de Desmond disponible en el software Schrödinger-Maestro usando un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a 1 atm y 310.15 K, empleando un acoplamiento de temperatura y un reajuste de velocidad con un término estocástico y un esquema de 6 pasos de equilibrio predeterminado en el programa, que consiste en simulaciones cortas con restricciones de movimiento e incremento de temperatura hasta alcanzar un sistema sin restricciones a la temperatura de trabajo, usando el termostato de Nosé-Hoover y barostato de Martyna-Tobias-Klein (Nosé, 1984; Hoover, 1985; Martyna y col., 1994). Se utilizó el modelo de agua TIP3P y lípidos POPC (ver

residuos de membrana en cuadro 2. La producción de la simulación fue de 300 ns para cada variante del receptor pentamérico construida con intervalo de registro de la trayectoria cada 100 ps. El análisis de trayectoria se realizó en el módulo *Desmond Trajectory Clustering* para obtener la conformación más representativa de la simulación (C1). Los análisis de trayectoria se realizaron en el módulo *Simulations Interactions Diagram* en Maestro.

Cuadro 2. Residuos de membrana (UNIPROT, 2021).

Subunidad	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$
Código UNIPROT	P14867	P14869	P34903
Residuos	252-273, 279-300, 313-334, 422-443.	252-273, 279-300, 313-334, 420-441.	277-298, 304-325, 338-259, 458-479.

### 4.3. Identificación del sitio y forma de unión de los ligandos selectos por acoplamiento molecular.

Para delimitar la zona de búsqueda de conformaciones energéticamente favorecidas en sitios de unión de la proteína, se calculó la *gridbox* utilizando la posición de los ligandos seleccionados (GABA y padsevonil) en las cristalografías reportadas (6X3X y 6X3Z respectivamente, ver cuadro 3), siendo la posición de GABA entre las interfaces alfa-beta, y la interfaz alfa-gama para padsevonil, utilizando AutoGrid 4.2.6. El acoplamiento molecular se realizó en el programa AutoDock 4.2.6 optimizado para unidades de procesamiento gráfico (AutoDock-GPU) utilizando 100 corridas y 100 millones de evaluaciones con un algoritmo genético Lamarckiano (Santos-Martins, 2021). De los resultados del acoplamiento molecular se obtuvo la conformación más probable de unión, representada por el clúster de resultados más numeroso obtenido por docking, para los cálculos posteriores, descritos en el siguiente punto.

Cuadro 3. Coordenadas utilizadas para acoplamiento molecular (Kim y col., 2020).

Ligando	Coordenadas						Aminoácidos cercanos
GABA	1	X	93.04	Y	128.24	Z	TYR157, THR160, THR202 y TYR205 de la subunidad beta2, y PHE64 de la subunidad alfa1.
	2		115.54		153.84		
Padsevonil			89.47		125.99		

							MET130 y THR142 de la subunidad gamma2.
--	--	--	--	--	--	--	---

#### 4.4. Optimización de los complejos ligando-receptor por simulaciones de dinámica molecular.

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de los complejos ligando-receptor, obtenidas por acoplamiento molecular en el objetivo anterior, en el módulo de Desmond de Schrödinger-Maestro, usando las condiciones indicadas en la sección 4.2 para la simulación de los modelos del receptor sin ligandos. El agrupamiento se realizó en el módulo *Desmond Trajectory Clustering* para obtener la conformación más representativa de la simulación (C1). Los análisis de trayectoria se realizaron en el módulo *Simulations Interactions Diagram* en Maestro.

#### 4.5. Cuantificar el efecto de la unión de los ligandos selectos a la estructura del receptor.

Considerando que las subunidades forman un pentámero, se calcularon las distancias entre cada subunidad adyacente para posteriormente obtener las áreas de cada variante del receptor a lo largo de la trayectoria, en ausencia y presencia de los ligandos seleccionados, para finalmente encontrar las diferencias entre los radios y áreas iniciales y finales. Se utilizaron los códigos ASL (Atom Specification Language) (cuadro 4) de los segmentos transmembranales dos de cada subunidad, ya que se ha reportado que el movimiento de dicho segmento tiene como consecuencia la permeabilidad del poro para el paso de los iones cloruro (Chuang y Reddy, 2018).

Cuadro 4. Códigos ASL.

Subunidad	Residuos segmento transmembranal 2	Cadenas pertenecientes	Código ASL
$\alpha_1$	279-300	A y C	(res.num 279-300) AND ((chain name A))
$\alpha_2$	279-300		(res.num 279-300) AND ((chain name C))
$\alpha_3$	304-325		(res.num 304-325) AND ((chain name A)) (res.num 304-325) AND ((chain name C))
$\beta_2$	270-292	B y D	(res.num 270-292) AND ((chain name B)) (res.num 270-292) AND ((chain name C))

$\beta_3$	271-293		(res.num 271-293) AND ((chain name B)) (res.num 271-293) AND ((chain name D))
$\gamma_2$	300-322	G	(res.num 300-322) AND ((chain name G))

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Construcción de los modelos computacionales de cuatro variantes del receptor heteropentamérico GABA<sub>A</sub>.

#### 5.1.1 Modelado de las subunidades de los GABA<sub>A</sub>R

En el cuadro 5 se enlistan los resultados obtenidos del modelado de las subunidades a estudiar. El C-score (puntuación C) es una puntuación de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER. Se calcula en función de la importancia de las alineaciones de la plantilla del templado y los parámetros de convergencia de las simulaciones de ensamblaje de la estructura. Esta puntuación suele estar en el rango de -5 a 2, donde una C-score de valor más alto significa un modelo de alta confianza (Yang J, 2015). Nuestros resultados de C-score para todas las subunidades resultaron ser buenas debido a que se encuentran en el rango de confianza.

Cuadro 5. Resultados de I-TASSER de las subunidades construidas por homología.

Subunidad	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\gamma_2$
Referencia	6D6TB	6D6TB	6D6TB	6D6TB	4COF	6D6TB
% de identidad	-	81.34	74.14	-	-	-
C-score	0.61	1.44	2.23	-2.22	-1.79	-2.18
TM-score	0.64±0.13	0.54±0.15	0.45±0.15	0.45±0.15	0.50±0.15	0.46±0.15
RMSD (Å)	8.3±4.5	10.3±4.6	12.5±4.3	12.6±4.3	11.3±4.5	12.2±4.4

El TM-score (puntuación TM) y RMSD son estándares conocidos para medir la similitud estructural entre dos estructuras proteicas, que generalmente se usan para medir la precisión del modelado de estructuras cuando se conoce la estructura nativa. En caso de que no se conozca la estructura nativa, es necesario predecir la

calidad de la predicción del modelo, es decir, la distancia entre el modelo predicho y las estructuras nativas. Para ello se predice la TM-score y RMSD de los modelos predichos en relación con las estructuras nativas basadas en el C-score. El propósito de proponer TM-score es resolver el problema de RMSD que es sensible al error local. Debido a que el RMSD es una distancia promedio de todos los pares de residuos en dos estructuras, un error local generará un gran valor de RMSD, aunque la topología global sea correcta. Sin embargo, en el TM-score, la distancia pequeña se pondera más que la distancia grande, lo que hace que la puntuación sea insensible al error de modelado local. Un TM-score  $> 0.5$  indica un modelo de topología correcta y TM-score  $< 0.17$  significa una similitud aleatoria. Estos cortes no dependen de la longitud de la proteína (Yang J, 2015). En el caso de nuestras subunidades de estudio podemos observar que  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  tienen una topología correcta ya que sus TM-score son mayores a 0.5 ( $0.64 \pm 0.13$  y  $0.54 \pm 0.15$ , respectivamente). Para el caso de los RMSD de todas las subunidades son mayores a 2 Å, por lo cual podemos decir que hay diferencias significativas entre las estructuras predichas y los modelos nativos.

Posteriormente, se evaluó la calidad de las subunidades en el servidor web Molprobit (Williams y col., 2018), cuyos resultados se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Calidad de las subunidades en Molprobit

Subunidad	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\gamma_2$
Rotámeros aceptables (%)	10.21	13.03	6.11	13.73	11.50	11.73
Ramachandran favorecidos (%)	79.63	77.43	77.43	74.23	75.34	72.07
Ramachandran atípicos (%)	9.13	8.08	6.93	9.07	8.74	13.15
Z-score	$-4.16 \pm 0.36$	$-4.22 \pm 0.35$	$-4.22 \pm 0.35$	$-5.76 \pm 0.29$	$-3.84 \pm 0.35$	$-5.54 \pm 0.32$

Los diagramas de Ramachandran nos informan la distribución de los ángulos de torsión ( $\phi$ ,  $\psi$ ) de la columna vertebral de la proteína y son métricas de mejor calidad de los modelos de estructura experimental. Por lo general, el software de validación informa la cantidad de residuos que pertenecen a las regiones "atípicas", "permitidas" y "favorecidas". Si bien "cero valores atípicos no explicados" puede considerarse el "estándar de oro" actual, esto puede ser engañoso si no se consideran las desviaciones de las distribuciones esperadas, incluso dentro de la región favorecida.

Por lo tanto, debemos revisar también el Z-score (el puntaje Z de Ramachandran), que es una métrica global que proporciona una evaluación general de la calidad del modelo, pero no puede informar sobre problemas locales con la conformación principal de la cadena (Sobolev, 2020). Los residuos de Ramachandran favorecidos deben tener un valor  $\geq 98\%$  para considerarse bueno,  $95-98\%$  para considerarse con precaución, y  $< 95\%$  se considera como malo. Podemos observar que la puntuación para los residuos de Ramachandran favorecidos no es nada favorable para todas las subunidades (cuadro 6). Para el caso de los atípicos (*outliers*), se consideran en un rango bueno si estos son  $\leq 0.05\%$ , precaución si son de  $0.05$  a  $0.5\%$ , y peligro si es mayor a  $0.5\%$ . En el cuadro 6 podemos ver que todas las subunidades obtuvieron valores por encima de los  $0.5\%$  por lo que podemos decir que sus aminoácidos *outliers* de Ramachandran no son buenos. Para los valores del Z-score, éste es bueno cuando es  $\leq 2$ , precaución cuando es de  $2$  a  $3$ , y peligro cuando su valor es  $> 3$ . Todas las subunidades evaluadas obtuvieron valores de Z-score menores a  $2$ , por lo cual podemos decir que son resultados buenos (Sobolev, 2020).

Debido a que los resultados de calidad de las subunidades en general no fueron favorables, se realizaron simulaciones de dinámica molecular una vez construidos los pentámeros para relajar las conformaciones de los complejos.

### 5.1.2 Construcción de las variantes del receptor GABA<sub>A</sub> por alineamiento y relajación por simulaciones de dinámica molecular.

Una vez construidos los pentámeros se evaluó su calidad en el servidor web Molprobit. Podemos observar en el cuadro 7 que los residuos favorecidos de Ramachandran y los *outliers* no obtuvieron valores buenos, pero sí de Z-score, para todos los pentámeros construidos.

Cuadro 7. Calidad de los pentámeros en Molprobit previos a la simulación.

Subunidad	$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	$\alpha_3\beta_2\gamma_2$	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$
Rotámeros aceptables (%)	13.50	13.73	13.29	12.04
Ramachandran favorecidos (%)	75.51	77.45	76.25	76.72
Ramachandran atípicos (%)	9.96	7.41	8.88	9.32
Z-score	$-4.8 \pm 0.15$	$-4.58 \pm 0.15$	$-5.04 \pm 0.14$	$-4.44 \pm 0.15$

Se construyeron los sistemas para cada pentámero con modelo de membrana POPC, usando como referencia los residuos de membrana de cada subunidad alfa como se pudo observar en el cuadro 2, solvente TIP3P, tamaño de caja a:15 b:15 c:25, NaCl 0.15 M. Se corrieron dinámicas de 300 ns ya que se ha reportado que se requieren largos tiempos de simulación (desde 100 hasta 300 ns) para observar cambios relevantes en este tipo de receptores (Alegría-González, 2019), con ensamble NTP, temperatura 310.15 K y presión 1.01325 bar constantes. Los análisis de trayectoria se realizaron en el módulo *Simulations Interactions Diagram* en Maestro.

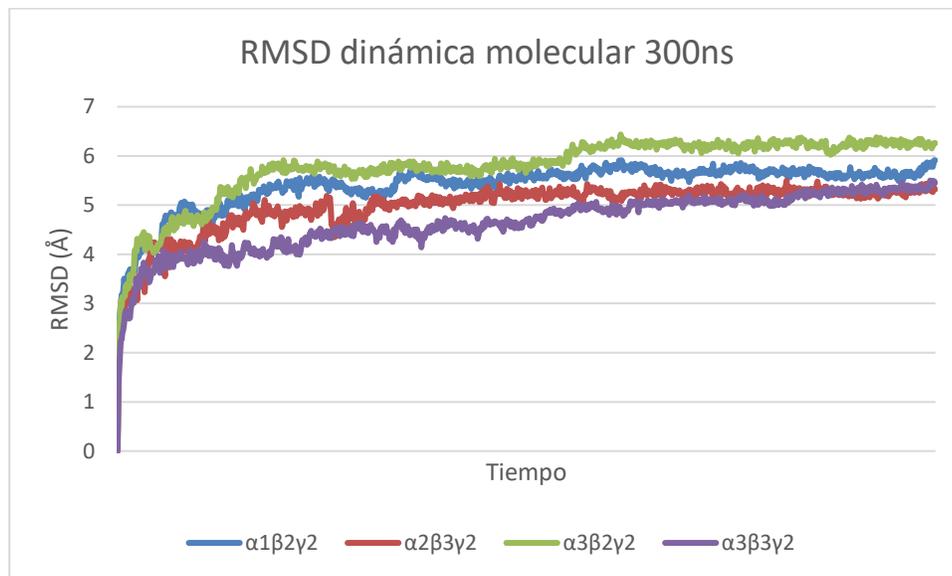


Figura 3. RMSD de la dinámica molecular de 300ns todas las variantes.

El seguimiento del RMSD (desviación cuadrática media) de la proteína puede brindar información sobre su conformación estructural a lo largo de la simulación, proporcionando una indicación de la estabilidad de la proteína y si la simulación se ha equilibrado (Schrödinger, 2019). En la gráfica de RMSD de todas las variantes de la figura 3 se demuestra que los pentámeros llegan a un estado de convergencia a partir de los 200 ns y se mantienen estables durante el resto de la trayectoria.

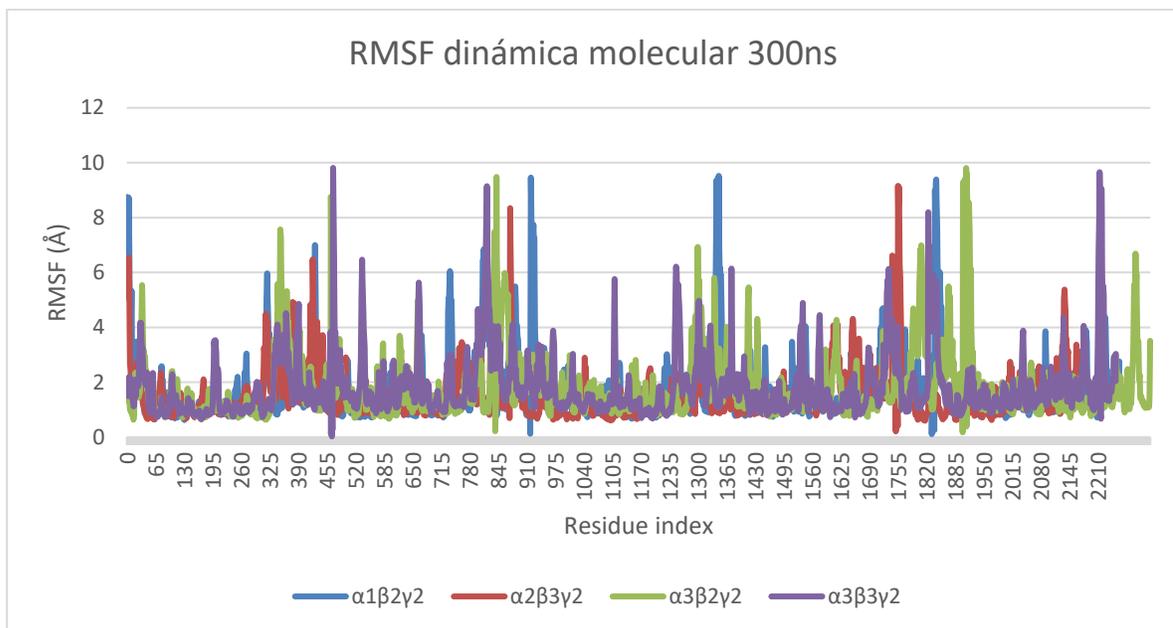


Figura 4. RMSF de la dinámica molecular de 300ns todas las variantes.

Las fluctuaciones cuadráticas medias de la raíz (RMSF) de los residuos nos permite la visualización de segmentos a lo largo de la proteína que fluctúan más durante la simulación. La gráfica de RMSF de la figura 4 nos muestra el grado de movimiento de los carbonos alfa de cada variante a lo largo de la simulación de dinámica molecular (Schrödinger, 2019). Podemos observar un patrón de movimiento en las convergencias de las señales para cada subunidad de cada pentámero. En el cuadro 8 se muestran los giros representativos de cada subunidad de cada variante estudiada para este caso.

Cuadro 8. Cantidad de movimientos representativos de las variantes en sus dinámicas moleculares de 300ns.

Variante	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Variante	Cadena	Residuo	RMSF (Å)
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	A	LEU31	6.73	$\alpha_3\beta_2\gamma_2$	A	ASN63	5.54
		GLY346	5.16			ALA377	5.83
		HIS455	5.76		B	SER26	8.76
	B	PHE330	4.98			SER225	5.00
		THR408	6.40			VAL421	5.65
		ASP480	4.65		C	ALA377	6.93
	C	PRO29	10.80			THR415	5.80
		GLN32	8.65			THR444	4.01
		GLN465	13.18			GLN492	5.01
	D	MET33	5.90		D	THR417	6.84

$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	G	ASP44	12.44	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	G	VAL484	5.15
		ALA50	9.39			GLU47	10.48
	A	TRP316	3.45		A	HIS435	5.62
		LEU350	5.10			GLU384	3.82
	B	GLU378	4.93		B	GLN446	8.32
		LYS380	4.70			ILE414	5.52
	C	ASN448	1.67		C	ILE338	11.42
		TYR172	2.90			ARG462	5.16
	D	ASP30	2.26		D	ALA332	4.41
		ALA324	4.11			PRO415	5.68
		ILE360	4.17		G	LYS52	17.42
	PRO20	4.97	ASN323			3.51	
	GLY393	5.38	HIS392			5.70	

Para obtener la conformación más representativa de la trayectoria, como se muestra en el cuadro 9, se usó el módulo *Desmond Trajectory Clustering*. El programa utiliza los fotogramas (frames) utilizados para calcular el RMSD para el agrupamiento que se seleccionan de la trayectoria en un intervalo específico y, de forma predeterminada, los frames se superponen antes de calcular el RMSD. A continuación, la matriz RMSD se utilizó en el método de agrupamiento por propagación de afinidad, el cual toma como entrada medidas de similitud entre pares de puntos de datos, con un número máximo de agrupaciones especificado. Los resultados incluyen un marco representativo de cada grupo (Frey y Dueck , 2007).

Cuadro 9. Elección del clúster representativo de las variantes.

Variante	Frecuencia	Total de clústeres	Total de conformaciones en cada clúster	Frame	Tiempo
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	6	31	17 y 14	732	219.ns
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	8	46	17, 15 y 14	776	232.8 ns
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$	9	44	17, 15 y 12	927	278.1 ns
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	10	35	13, 12 y 10	820	245.7 ns

En el cuadro 10 se muestran las evaluaciones de la calidad del complejo  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  en el tiempo cero (F1), cluster representativo (C1) y la estructura final de la trayectoria (F1001) en el servidor web MolProbity.

Cuadro 10. Calidad de las variantes en diferentes tiempos.

Variante	Estructura	Rotámeros aceptables (%)	Ramachandran favorecidos (%)	Ramachandran atípicos (%)	Z-score
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	F1	8.21	78.62	5.78	-5.39±0.13
	C1	4.80	83.02	2.63	-4.94±0.13
	F1001	4.85	82.89	2.76	-5.00±0.13
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	F1	7.61	80.05	5.32	-5.20±0.14
	C1	5.09	84.95	3.47	-4.79±0.14
	F1001	4.84	84.07	3.24	-4.65±0.14
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$	F1	8.21	83.02	5.78	-4.94±0.13
	C1	4.80	78.62	2.63	-5.39±0.13
	F1001	4.85	82.69	2.76	-5.00±0.13
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	F1	8.21	78.62	5.78	-4.94±0.13
	C1	4.80	83.02	2.63	-5.39±0.13
	F1001	4.85	82.89	2.76	-5.00±0.13

Se alinearon los tres complejos en Pymol para conocer sus RMSD (cuadro 11), esto con la finalidad de buscar diferencias significativas entre las distancias de cada variante a diferentes tiempos.

Cuadro 11. Alineación de las variantes a diferentes tiempos.

Variante	Pentámeros alineados	RMSD (Å)
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	C1/F1	3.793
	F1001/F1	3.691
	C1/F1001	1.764
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	C1/F1	3.643
	F1001/F1	3.787
	C1/F1001	1.643
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$	C1/F1	4.759
	F1001/F1	4.881
	C1/F1001	1.405
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	C1/F1	4.276
	F1001/F1	4.252
	C1/F1001	1.602

Las alineaciones nos demuestran que tan parecida es una estructura con otra. Podemos observar en el cuadro 11 en los RMSD de las comparaciones del clúster 1 con el *frame 1*, y el *frame 1* con el último *frame*, que hay diferencias significativas

entre esas estructuras, ya que su RMSD es mayor a 2 Å. Por otro lado, en la comparación entre el clúster 1 con el último *frame*, no hay diferencias significativas ya que su RMSD es muy pequeño, por lo cual podríamos decir que la estructura del clúster 1 es parecida a la del último *frame*. Con la información obtenida del *clustering* y del alineamiento, se decidió utilizar la estructura del clúster uno para cada variante para realizar los cálculos posteriores.

## 5.2 Identificación del sitio y forma de unión de los ligandos selectos por acoplamiento molecular.

### 5.2.1 Identificación del modo de unión de GABA y padsevonil por acoplamiento molecular.

Se realizaron los acoplamientos moleculares con las coordenadas de los PDB obtenidos de las cristalografías 6X3X para GABA, y 6X3Z para padsevonil, ligando que se ha demostrado que se une al sitio común de benzodiazepinas (Niespodziany y col., 2020). Para este último caso se utilizaron las coordenadas de la molécula unida en la variante  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  para las simulaciones de dinámica molecular en el resto de las variantes. En el caso de GABA, se usaron las conformaciones más cercanas a los ligandos de la cristalografía (ver Cuadro 12) para construir los complejos de los siguientes cálculos.

Cuadro 12. Resultados de acoplamiento molecular.

Docking score (kcal/mol)			
Pentámero	GABA 1	GABA 2	Padsevonil
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	-4.09	-4.66	Best Cluster -4.43
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	-3.43	-3.39	
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$	-3.80	-5.17	
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	-4.39	-3.92	

### 5.2.2 Optimización de los complejos ligando-receptor por simulaciones de dinámica molecular.

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de 100 ns utilizando el clúster 1 de la dinámica anterior del pentámero solo, con GABA, con padsevonil, y con GABA

y padsevonil. Los análisis de trayectoria se realizaron en el módulo *Simulations Interactions Diagram* en Maestro para cada variante con todos los experimentos.

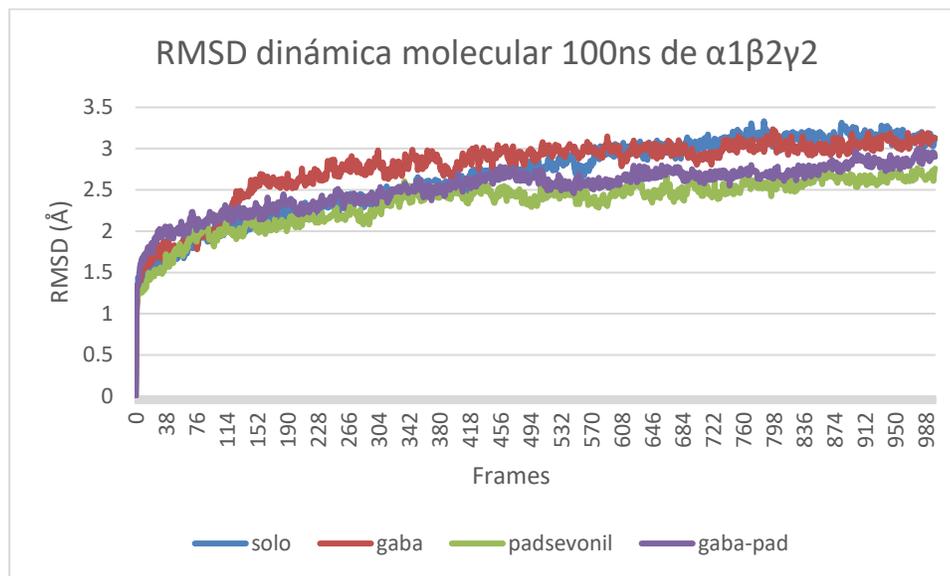


Figura 5. RMSD de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  con y sin ligandos.

Para el complejo  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , la gráfica de RMSD de la figura 5 demostró que el pentámero solo se estabiliza alrededor de los 70ns, en comparación con los demás experimentos, tarda más en estabilizarse en ausencia de ligandos. Por otro lado, podemos observar que en presencia de GABA, padsevonil, y GABA con padsevonil, el pentámero llega a un estado de convergencia alrededor de los 15 ns, y los cambios posteriores que presentan son mínimos.

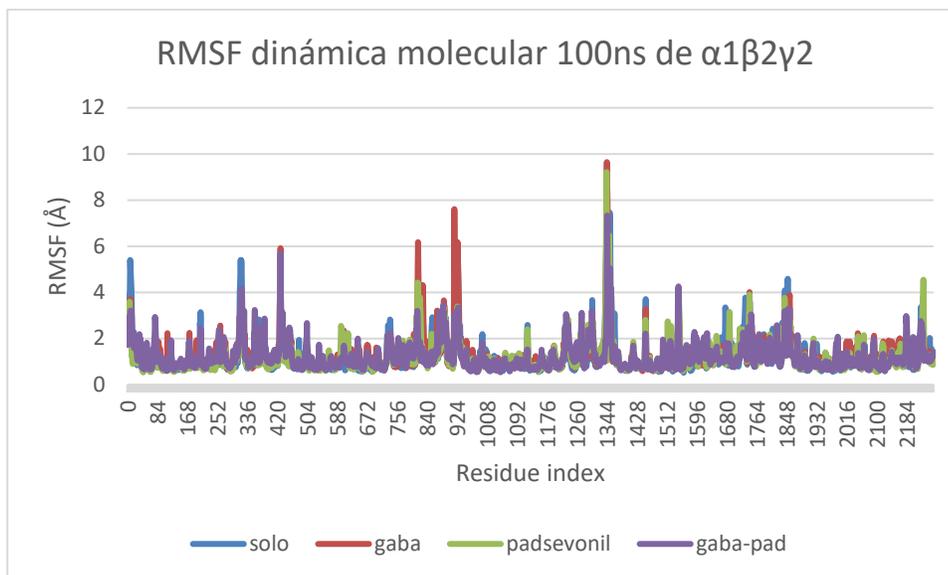


Figura 6. RMSF de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  con y sin ligandos.

La gráfica de RMSF de la figura 6 nos muestra el movimiento de los carbonos alfa de esta variante a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular, en presencia y ausencia de ligandos. En el cuadro 13 se muestran los giros representativos de cada subunidad de cada experimento estudiado para esta variante. Podemos observar que, globalmente, aparenta haber menos giros y con un RMSD menor en la subunidad gama de esta variante en los distintos experimentos. Cuando esta variante se encuentra en ausencia de ligandos, sus residuos se mueven más en comparación al comportamiento que observamos cuando se encuentra con GABA, donde se mueven menos residuos. También podemos apreciar que hay coincidencias en los movimientos de algunos residuos para cada experimento (las cuales se marcan en amarillo), por ejemplo, para la cadena A, el residuo ASP345 sobresale en los experimentos del pentámero solo, con padsevonil, y con GABA y padsevonil, y VAL349 en el pentámero solo y con GABA; para la cadena B, GLU410 en el perntámero solo, con padsevonil, y con GABA y padsevonil, LYS412 en el pentámero solo, con GABA y con padsevonil, VAL484 para el pentámero solo y con padsevonil, y LEU409 para el pentámero con padsevonil y con GABA y padsevonil. Estas coincidencias de movimientos de residuos en cada experimento corresponden

a distintas zonas del receptor, como, los de la cadena A, B, C y G (subunidad alfa, beta, alfa y gama, respectivamente) corresponden a residuos del dominio citoplasmático de cada subunidad, y los de la D corresponden al dominio extracelular de la subunidad beta.

Cuadro 13. Movimientos representativos de la variante  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  con y sin ligandos.

$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ solo			$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con GABA			$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con padsevonil			$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con GABA y padsevonil		
Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)
A	GLY106	3.14	A	VAL349	3.15	A	ASP345	2.32	A	TRP344	3.00
	GLN231	2.59		GLN456	4.42		LYS347	2.50		ASP345	3.82
	SER233	3.14	B	LYS412	6.18	ASP196	2.55	LYS347		4.16	
	TYR342	2.59	C	GLN28	7.61	ASN197	2.44	VAL349		2.98	
	TRP344	4.27	D	SER26	8.67	LEU409	2.99	LYS353		2.25	
	ASP345	5.41		VAL135	2.31	GLU410	3.20	SER392		2.48	
	VAL349	4.16		PHE224	2.83	LYS412	3.86	LYS411		2.72	
	VAL350	3.36		GLY425	4.01	ALA416	2.90	HIS455		2.92	
	LYS353	2.40	G	ALA50	3.50	ILE487	3.10	GLY344		2.26	
GLU399	2.68	GLY64		3.88	LEU481	2.57	LEU409	3.19			
B	PHE330	2.12		HIS435	2.65	VAL484	3.06	GLU410	3.19		
	GLY332	2.45	B	TRP344	2.37	TRP344	2.37	ALA471	2.81		
	GLY334	2.74		LYS347	2.85	LYS347	2.85	GLN473	2.64		
	GLU410	2.64		GLY385	2.72	GLY385	2.72	THR482	3.44		
	LYS412	2.74		THR404	2.18	THR404	2.18	GLY346	2.48		
	ASN413	2.73		C	VAL223	2.18	VAL223	2.18	TRP344	2.69	
	PHE451	2.64			SER228	3.37	SER228	3.37	GLY385	3.11	
	GLY452	2.91			PHE224	3.57	PHE224	3.57	PHE413	2.58	
	THR482	3.07		D	TYR229	2.67	TYR229	2.67	PHE224	2.72	
	VAL484	3.15			GLY423	3.05	GLY423	3.05	SER407	2.29	
ASN485	2.82	G		ASN393	2.44	ASN393	2.44	SER429	3.05		
SER233	2.48		ILE438	3.91	ILE438	3.91	MET391	2.98			
SER415	3.66		ALA439	4.54	ALA439	4.54	ASN393	2.67			
VAL416	2.60	D					ARG433	2.68			
ALA451	2.59		THR134	3.70	THR134	3.70					
			ASP356	2.33	ASP356	2.33					
			VAL357	3.34	VAL357	3.34					
			ILE411	2.98	ILE411	2.98					
			LYS412	3.33	LYS412	3.33					
			GLU414	3.37	GLU414	3.37					
			ASP426	3.58	ASP426	3.58					
			SER429	2.14	SER429	2.14					
		TRP490	2.14	TRP490	2.14						
G	GLY432	3.36									

	ARG433	2.87			
	HIS435	2.52			

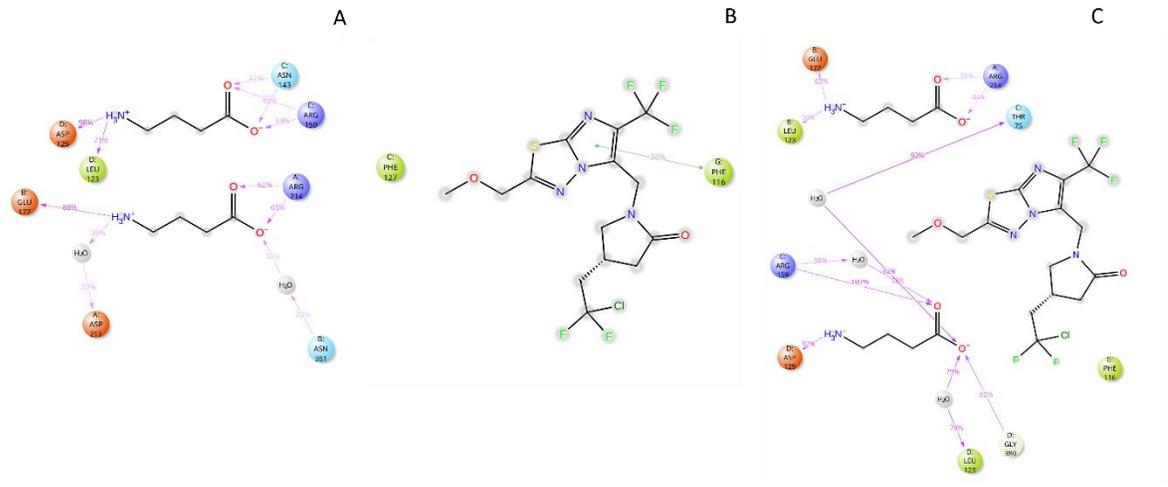


Figura 7. Diagrama de interacciones proteína-ligando de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  con ligandos.

En la figura 7, la sección A corresponde a la dinámica molecular 100ns del pentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  con los ligandos GABA, los cuales forman puentes de hidrógeno con los residuos ASP211 y ARG214 de la cadena A, GLU177 y ASN381 de la cadena B, ASN143 y ARG159 de la cadena C, LEU123 y ASP125 de la cadena D. La sección B corresponde a la dinámica con padsevoniol, que forma una interacción de tipo pi-pi con PHE116 de la cadena G, y se encuentra cerca del residuo PHE127 de la cadena C. La sección C corresponde a la dinámica con GABA y padsevoniol, donde los ligandos GABA forman puentes de hidrógeno con los residuos ARG214 de la cadena A, LEU123 y GLU177 de la cadena B, ARG74 y THR75 de la cadena C, LEU123, ASP125 y GLY380 de la cadena D, por otro lado, Padsevoniol se encuentra cerca del residuo PHE116 de la cadena G.

Se han reportado que existen residuos importantes para la unión de GABA, que corresponden a: TYR157, THR160, THR202 y TYR205 en la subunidad beta, y PHE64 para la subunidad alfa. Por otro lado, los residuos importantes para la unión a benzodiazepinas en su sitio conservado son: HIS102 y GLY201 en la subunidad alfa, y los residuos PHE77, MET130 y THR142 de la subunidad gama. Se sabe

también que hay residuos que influyen en la afinidad de las benzodiazepinas a su sitio, como lo son: TYR159, TYR161, THR162, THR206, TYR209 y VAL211 en la subunidad alfa, y los residuos LYS41-TRP82 y ARG114-ASP161 en la subunidad gamma 2 (Mehta y Ticku, 1999). En contraste con los resultados del diagrama de interacciones para esta variante podemos observar que nuestros ligandos no forman interacciones con los aminoácidos reportados importantes para la unión de GABA y de benzodiazepinas con padsevonil.

Para obtener la conformación más representativa de la trayectoria se usó el módulo *Desmond Trajectory Clustering* de Maestro como se muestra en el cuadro 14, donde podemos ver que la estructura representativa se encuentra alrededor de los 70 ns para los experimentos del pentámero solo y con GABA, y alrededor de los 90 ns para los experimentos con padsevonil y GABA con padsevonil.

Cuadro 14. Elección del cluster representativo del pentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ .

Experimento	Frecuencia	Total de clústeres	Total de conformaciones en cada clúster	Frame	Tiempo
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ solo	9	22	12 y 10	711	71 ns
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con GABA	10	30	13, 9 y 8	760	75.9 ns
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con padsevonil	9	42	16, 14 y 12	927	92.6 ns
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con GABA y padsevonil	8	26	14 y 12	920	92 ns

Cuadro 15. Calidad del pentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  a diferentes tiempos.

Experimento	Tiempo	Rotámeros aceptables (%)	Ramachandran favorecidos (%)	Ramachandran atípicos (%)	Z-score
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ solo	F1	7.04	80.22	4.84	-5.21±0.14
	C1	5.52	83.16	3.33	-4.85±0.14
	F1001	6.26	83.02	3.78	-5.13±0.13
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con GABA	F1	6.80	82.04	4.31	-5.25±0.13
	C1	5.12	82.71	3.51	-5.03±0.14
	F1001	5.57	82.01	4.04	-5.12±0.13
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con padsevonil	F1	7.49	82.58	4.53	-5.06±0.14
	C1	5.62	82.40	4.36	-4.74±0.14
	F1001	6.16	83.91	3.16	-4.82±0.14
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con GABA y padsevonil	F1	6.75	81.07	4.62	-5.15±0.14
	C1	6.35	82.58	3.64	-4.90±0.14
	F1001	5.96	82.84	3.64	-4.78±0.14

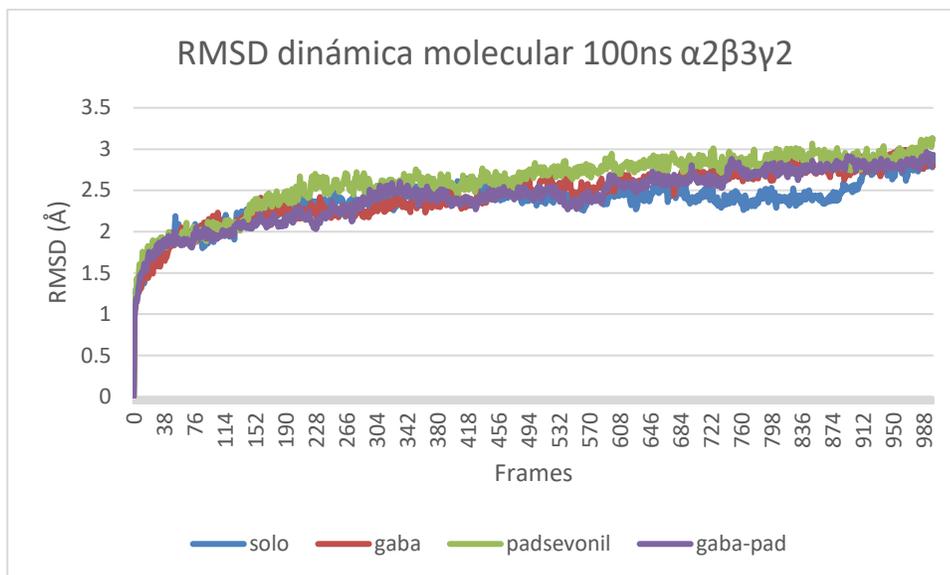


Figura 8. RMSD de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  con y sin ligandos.

Para el complejo  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ , podemos observar en la figura 8 que esta variante en ausencia de ligando se estabiliza alrededor de los 70 ns y tiene un cambio mínimo en los últimos 10 ns. Por otro lado, cuando el receptor se encuentra con ligandos, su RMSD se estabiliza alrededor de los 60 ns. para este caso podríamos concluir que el receptor tarda menos en estabilizarse en presencia de ligandos.

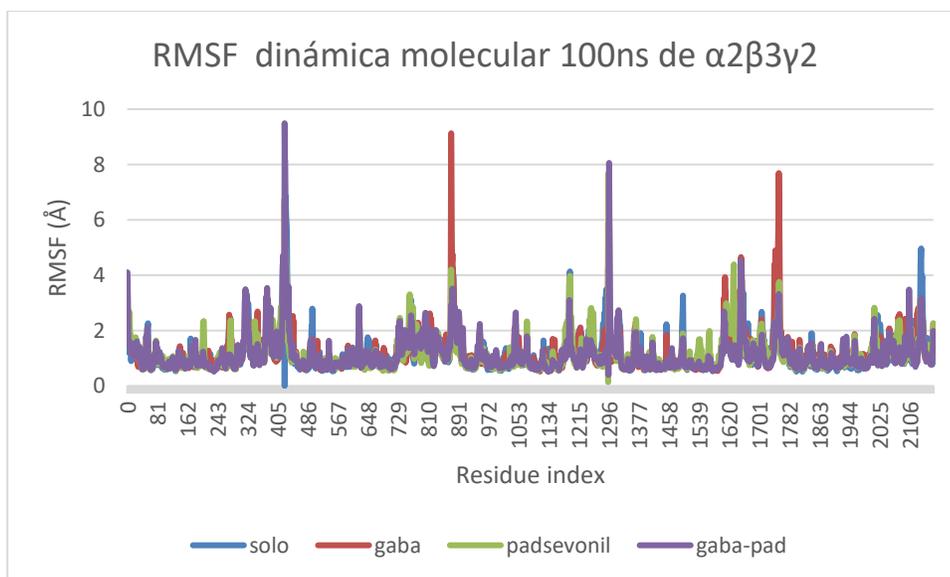


Figura 9. RMSF de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  con y

sin ligandos.

La gráfica de RMSF de la figura 9 nos muestra el movimiento de los carbonos alfa de esta variante a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular, en presencia y ausencia de ligandos. Podemos observar que, en presencia de GABA y de GABA con padsevonil el receptor presenta mayor movimiento que cuando el receptor se encuentra solo o con padsevonil. En el cuadro 16 se muestran los cambios representativos de cada subunidad de cada experimento estudiado para esta variante, y marcados en amarillo las coincidencias de movimientos de residuos para cada experimento. Podemos apreciar que en la cadena A el residuo VAL321 coincide en el experimento del pentámero solo y con GABA y padsevonil, y el residuo VAL421 en el pentámero solo y con padsevonil; en la cadena B los residuos ALA201 y ASN341 coinciden en el pentámero solo y con padsevonil; en la cadena C GLY318 y LYS319 para el pentámero solo, con padsevonil, y solo este último residuo en el experimento con GABA y padsevonil; para la cadena D, LYS315 para los experimentos del pentámero con GABA y el pentámero con padsevonil, GLY359 para el pentámero solo, con GABA y con GABA y padsevonil, ILE360 para el pentámero con GABA y con GABA y padsevonil. Para la cadena G, GLY393 para el pentámero solo y con padsevonil, ARG394 para el pentámero solo, con GABA y con GABA y padsevonil. Estos aminoácidos que coinciden en los distintos experimentos pertenecen a distintas zonas del receptor, como, los de la cadena A (subunidad alfa) a los segmentos transmembrales 3 y 4 de dicha subunidad, los de la cadena B (subunidad beta) corresponden al segmento extracelular y al segmento transmembrana 3 de dicha subunidad, los de la cadena C y D (subunidades alfa y beta respectivamente) al segmento citoplasmático y el segmento transmembranal 3 de ambas subunidades, y los residuos los de la cadena G (subunidad gama) al segmento citoplasmático de dicha subunidad.

Cuadro 16. Movimientos representativos de la variante  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  con y sin ligandos.

$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ solo			$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con GABA			$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con padsevonil			$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con GABA y padsevonil		
Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)
A	VAL321	2.11	A	PRO227	2.32	A	LYS381	2.63	A	GLY318	3.21
	ASP324	2.57		GLY420	2.76		THR382	2.75		VAL321	3.34
	LYS325	2.89		B	GLY392		2.62	ASN414		2.86	VAL322
	GLU328	2.15	C	SER175	2.22		GLY420	3.42		LYS375	2.88
	ARG415	2.34	D	ALA73	2.11		VAL421	2.89		ALA379	3.14
	VAL421	3.78		GLN312	2.46	ALA201	2.19	GLY308		2.16	
	PRO423	3.36		LYS315	3.93	PRO311	2.46	PRO311	2.34		
ALA201	2.11	ASN341		3.45	VAL336	3.07	LEU344	2.33			
B	ASN341	3.11	GLY359	4.58	ALA338	3.31	ARG378	2.41			
	ILE342	2.36	ASP362	2.79	ASN341	2.94	SER381	2.62			
	ILE360	2.20	ILE360	4.41	GLY313	2.33	VAL321	2.52			
	GLY318	2.16	ASN336	2.10	GLY318	2.62	LYS319	3.10			
C	LYS319	3.78	LYS334	2.51	LYS319	3.65	GLN312	2.23			
	VAL321	4.14	PRO337	2.60	LYS315	2.52	SER357	3.40			
	PRO417	2.56	PRO339	2.05	LYS320	2.77	GLY359	4.16			
	VAL418	3.25	GLN351	2.11	ALA338	3.88	ILE360	3.81			
	ALA201	2.74	MET352	2.43	HIS339	4.39	GLU364	2.66			
D	THR202	3.27	GLY393	2.54	GLY269	2.83	ARG394	3.00			
	ALA324	2.23	ARG394	2.60	HIS396	2.58					
	GLY359	3.27			GLY393	3.15					
	THR363	2.43									
	ASP416	2.14									
	THR278	2.57									
G	GLY393	3.28									
	ARG394	4.39									
	ILE397	3.63									

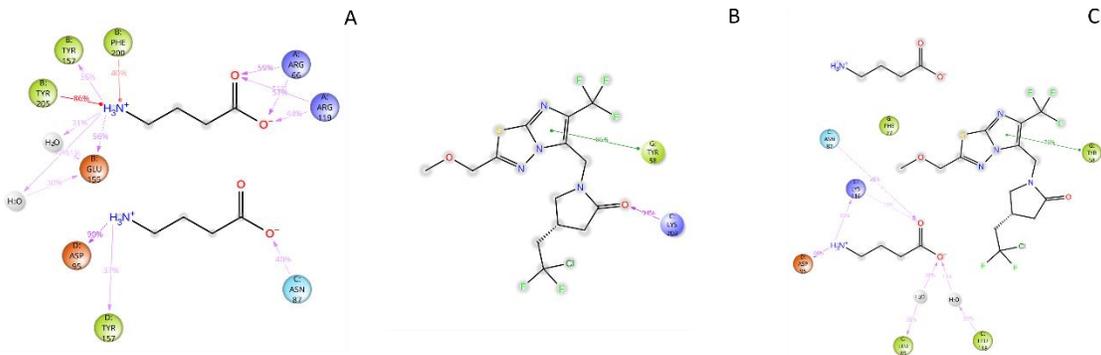


Figura 10. Diagrama de interacciones proteína-ligando de las dinámicas

moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  con ligandos.

La sección A de la figura 10 corresponde a la dinámica molecular 100ns del pentámero  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  con los ligandos GABA, los cuales forman puentes de hidrógeno con los residuos ARG66 y ARG119 de la cadena A, GLU155, TYR157, PHE200 y TYR205 de la cadena B, ASN87 de la cadena C, ASP95 Y TYR157 de la cadena D. La sección B corresponde a la dinámica con padsevonil, que forma una interacción de tipo pi-pi con TYR58 de la cadena G, y otra de tipo puente de hidrógeno con LYS203 de la cadena C. La sección C corresponde a la dinámica con GABA y padsevonil, donde se demuestra que solo interactúa uno de los ligandos GABA formando puentes de hidrógeno con los residuos LEU85, ASN87, LYS116 y LEU188 de la cadena C, ASP95 de la cadena D. Padsevonil interactúa con TYR58 de la cadena G.

Los residuos TYR157 y TYR205 de las cadenas B y D que forman interacciones con los ligandos GABA en la sección A (que corresponden a subunidades beta) son aminoácidos importantes para la unión de GABA reportados en la bibliografía. Por otro lado, en la sección B podemos observar que padsevonil forma interacciones con el residuo LYS203 de la cadena C (correspondiente a una subunidad alfa), el cual no se ha reportado como relevante, pero se encuentra bastante cercano a GLY201 el cual es un residuo importante para la unión de benzodiazepinas (Mehta y Ticku, 1999). Para obtener la conformación más representativa de la trayectoria se usó el módulo *Desmond Trajectory Clustering* en Maestro. Como se muestra en el cuadro 17, las estructuras representativas de los experimentos se encontraron en su mayoría después de la mitad del tiempo de simulación (el pentámero solo, con padsevonil, y GABA con padsevonil a los 88, 84.5 y 63.9 ns respectivamente), por otro lado, en el experimento del pentámero con GABA esta se encontró a los 44.6 ns.

Cuadro 17. Elección del cluster representativo del pentámero  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ .

Experimento	Frecuencia	Total de clústeres	Total de conformaciones en cada clúster	Frame	Tiempo
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ solo	10	22	10 y 12	880	88 ns
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con GABA	3	35	19 y 16	447	44.6 ns
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con padsevonil	9	36	16, 10 y 10	846	84.5 ns
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con GABA y padsevonil	10	20	11 y 9	640	63.9 ns

Cuadro 18. Calidad del pentámero  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  a diferentes tiempos.

Experimento	Tiempo	Rotámetros aceptables (%)	Ramachandran favorecidos (%)	Ramachandran atípicos (%)	Z-score
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ solo	F1	6.74	83.46	3.75	-5.12±0.13
	C1	4.84	84.66	3.15	-4.98±0.14
	F1001	4.84	84.66	3.01	-4.80±0.14
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con GABA	F1	6.07	82.99	3.75	-5.25±0.13
	C1	4.84	84.01	3.10	-4.58±0.14
	F1001	5.71	84.24	2.97	-4.79±0.14
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con padsevonil	F1	6.74	83.09	3.61	-4.88±0.14
	C1	5.35	85.82	2.69	-4.76±0.14
	F1001	5.71	84.29	3.15	-4.70±0.15
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$ con GABA y padsevonil	F1	6.12	83.18	4.12	-4.94±0.14
	C1	5.61	83.97	3.10	-4.89±0.14
	F1001	5.76	84.40	3.34	-4.87±0.14

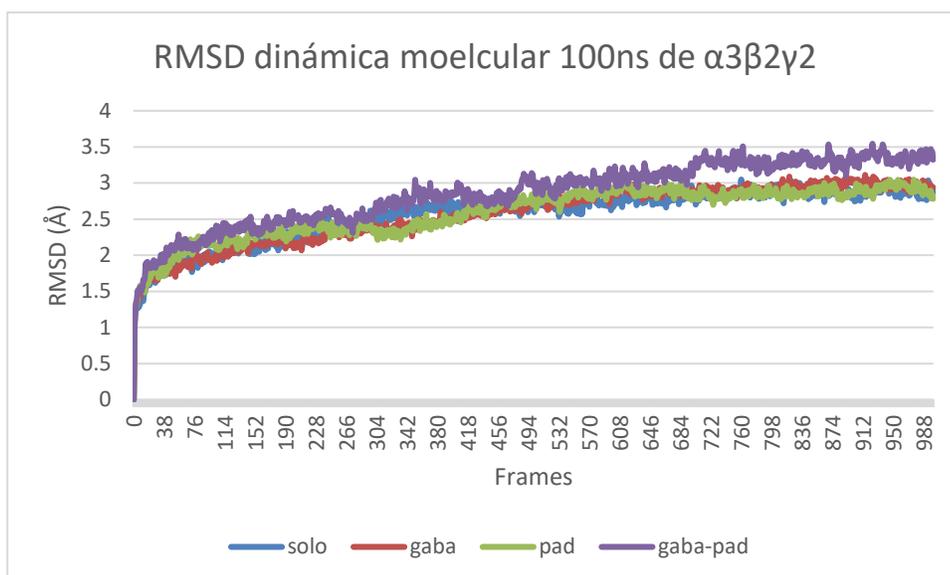


Figura 11. RMSD de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  con y sin ligandos.

Para el complejo  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  podemos observar en la figura 11, que el RMSD de este complejo se estabiliza alrededor de los 30 ns en ausencia de ligandos. En comparación a su estabilización en presencia de ligandos podemos ver que el receptor llega a un estado de convergencia a partir de los 60 ns. Para esta variante podemos concluir que se estabiliza más rápido en ausencia de los ligandos seleccionados.

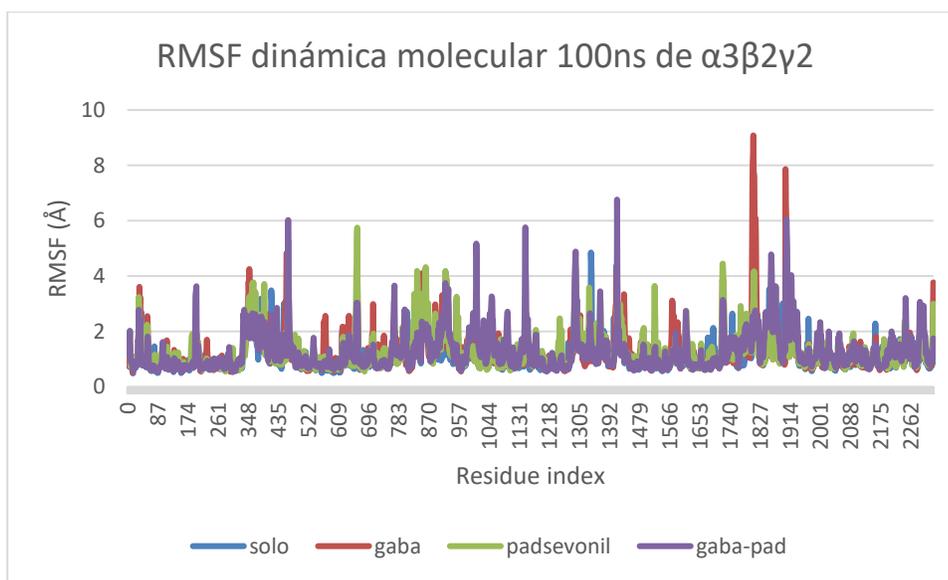


Figura 12. RMSF de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  con y sin ligandos.

En la gráfica de RMSF de la figura 12 podemos observar que, en presencia de ligandos el receptor presenta movimientos más grandes que en ausencia de ellos; por lo que podemos decir que presenta mayor número de aminoácidos con gran movimiento cuando se encuentra solo. En el cuadro 19 se muestran los giros representativos de cada subunidad de cada experimento estudiado para esta variante. En esta variante también podemos apreciar coincidencias en residuos (marcados con amarillo) que se mueven significativamente para algunos experimentos por ejemplo, para la cadena A, el residuo THR395 para el experimento de la variante sola, con GABA, y con padsevonil, ILE398 para el pentámero solo y con GABA, GLY400 para el pentámero con GABA y el pentámero con padsevonil;

para la cadena B, THR226 para el pentámero con padsevonil y el pentámero con GABA y padsevonil; para la cadena C, LYS373 para el pentámero solo, con padsevonil, y con GABA y padsevonil, THR444 para el pentámero con padsevonil, y el pentámero con GABA y padsevonil; para la cadena D, el residuo GLY334 para el pentámero con GABA y el pentámero con padsevonil, ALA471 para el pentámero con GABA, y con GABAGAB y padsevonil; y para la cadena G, el residuo GLY427 para el pentámero con padsevonil, y el pentámero con GABA y padsevonil. Estos residuos que coinciden en los distintos experimentos de esta variante, en la cadena A, C, D y G (subunidades alfa, alfa, beta y gama, respectivamente) corresponden al segmento citoplasmático, y los residuos de la cadena B (subunidad beta) al segmento extracelular de dicha subunidad.

Cuadro 19. Movimientos representativos de la variante  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  con y sin ligandos.

$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ solo			$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con GABA			$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con padsevonil			$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con GABA y padsevonil		
Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)
A	PRO394	3.15	A	LYS372	2.20	A	LYS382	2.74	A	GLY226	3.29
	THR395	3.41		GLU376	2.48		ALA389	3.55		SER336	2.79
	SER397	3.98		ALA377	3.12		SER393	3.78		ILE461	2.85
	ILE398	3.57		MET380	3.51		THR395	2.43	THR226	3.03	
	THR401	2.37		ALA387	2.45		GLY400	3.06	ARG333	3.32	
	GLY459	2.63		THR395	2.30		SER414	2.60	LYS363	2.79	
B	SER329	2.70		ILE398	2.44	ALA424	3.71	ILE365	2.76		
	GLU332	2.61		GLY400	2.57	VAL223	4.03	ARG466	2.32		
	SER333	2.85		ILE430	2.07	THR226	5.75	PRO479	3.14		
	VAL336	3.27		ALA484	2.36	ASP399	4.18	ILE478	2.93		
	ASN341	3.42	ILE485	2.78	PRO480	3.99	ASP283	2.61			
C	ASN200	3.05	GLY487	2.92	VAL421	3.11	GLY226	2.95			
	GLY343	2.17	ARG490	4.78	GLY423	4.19	ASN228	5.76			
	LYS362	3.31	VAL202	2.56	GLY425	4.07	LYS229	4.24			
	SER365	3.38	SER225	2.90	ASP426	3.25	LYS373	4.89			
	LYS373	2.45	SER228	2.39	LEU481	4.19	VAL374	4.16			
	TYR375	3.64	TYR362	2.29	ASP483	3.12	THR415	2.66			
	PRO376	3.97	ASP399	2.54	ASN327	2.47	GLU445	2.65			
	ASN378	3.49	PRO400	2.74	GLY371	3.42	THR444	3.45			
	LYS381	4.01	SER407	2.22	LYS373	4.27	THR226	2.40			
	ASP382	4.49	MET415	3.37	GLU376	2.97	PHE331	2.72			
LEU379	4.82	ALA416	3.54	PHE413	3.55	ARG470	3.50				
LYS390	3.65	SER418	2.59	THR444	3.23	ALA471	4.78				

	ALA392	2.61		VAL484	2.92		VAL135	3.64		GLN473	4.00
	ARG462	3.48		ARG489	3.00		SER225	2.53		ALA378	3.21
	LYS363	3.36		THR384	2.08		ARG333	3.93		ILE389	2.26
D	GLY171	2.83	C	ILE489	2.94	D	GLY334	3.79	G	TRP429	2.27
	ASP172	2.99		GLN492	3.81		MET422	4.18		GLY427	2.79
	PRO311	2.04		PHE331	3.87		GLY427	2.00			
	LYS320	2.68		GLY334	2.99		TYR466	2.24			
	ILE342	3.89		MET415	3.36						
	LEU344	3.10		GLY423	7.59						
	THR345	2.51		GLY425	6.10						
	ILE412	4.06		THR430	2.36						
	ILE414	3.06		ARG468	2.31						
	ASP192	2.47		ALA471	2.93						
G	THR193	2.44	G	ARG437	2.56						
	VAL312	2.47									
	PRO326	2.26									
	SER327	2.39									
	TRP390	2.24									
	ARG391	2.92									
	GLY393	4.21									
	HIS396	3.42									
	ILE394	3.50									

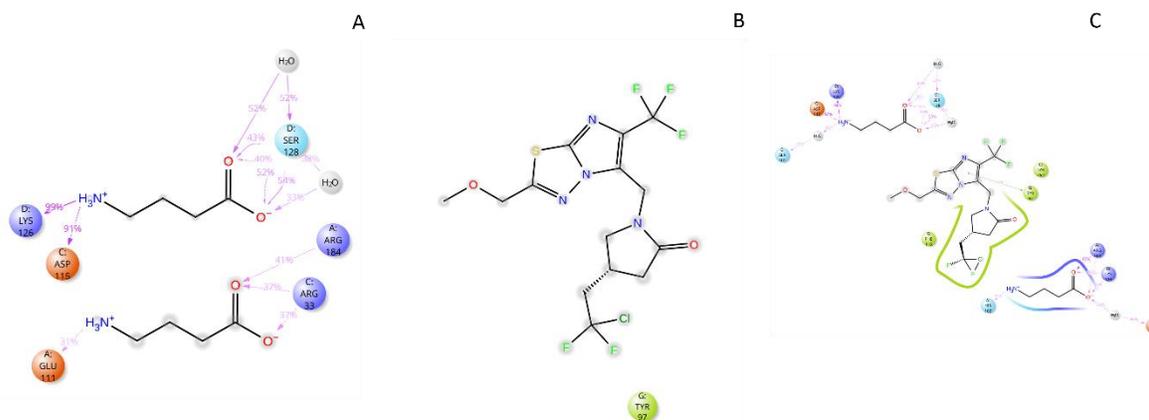


Figura 13. Diagrama de interacciones proteína-ligando de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  con ligandos.

En la sección A de la figura 13 corresponde a la dinámica molecular 100ns del pentámero  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  con los ligandos GABA, los cuales forman puentes de hidrógeno con los residuos GLU11 y ARG184 de la cadena A, ARG33 y ASP115 de la cadena C, LYS126 y SER128 de la cadena D. La sección B corresponde a la dinámica con

padsevonil, el cual no forma interacciones, pero se encuentra cerca de TYR97 de la cadena G. La sección C corresponde a la dinámica de GABA y padsevonil, donde los ligandos GABA forman puentes de hidrógeno con los residuos ASP115, HIS162 y ARG184 de la cadena A, LYS126 de la cadena B, SER101 y ASP115 de la cadena C, LYS126 y SER128 de la cadena D. Padsevonil interactúa con TYR97, y se encuentra cerca de TYR262 de la cadena G. Las interacciones observadas para los experimentos de esta variante no se han reportado como relevantes en la bibliografía. Para obtener la conformación más representativa de la trayectoria se usó el módulo *Desmond Trajectory Clustering*. Como se observa en el cuadro 20, se encontró una estructura representativa del pentámero solo a los 40.9 ns, por otro lado, para el resto de los experimentos, estas se encontraron más cercanas al final de la simulación, es decir, el pentámero con GABA a los 95.9 ns, con padsevonil a los 71.9 ns, y GABA con padsevonil a los 91.8 ns.

Cuadro 20. Elección del cluster representativo del pentámero  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ .

Experimento	Frecuencia	Total de clústeres	Total de conformaciones en cada clúster	Frame	Tiempo
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ solo	10	24	13 y 11	410	40.9 ns
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con GABA	3	50	15, 12, 12 y 11	966	95.9 ns
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con padsevonil	10	26	15 y 11	720	71.9 ns
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con GABA y padsevonil	6	30	17 y 13	918	91.8 ns

Cuadro 21. Calidad del pentámero  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  a diferentes tiempos.

Experimento	Tiempo	Rotámeros aceptables (%)	Ramachandran favorecidos (%)	Ramachandran atípicos (%)	Z-score
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ solo	F1	6.67	80.95	3.71	-5.01±0.13
	C1	4.75	82.28	2.89	-5.13±0.13
	F1001	4.94	83.02	2.72	-4.94±0.13
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con GABA	F1	5.47	82.04	3.75	-5.25±0.13
	C1	4.13	82.71	3.15	-5.03±0.14
	F1001	5.09	82.01	3.28	-5.12±0.13
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con padsevonil	F1	6.57	82.41	3.84	-5.02±0.14
	C1	5.13	83.58	3.62	-4.52±0.14
	F1001	5.71	84.01	2.67	-4.77±0.13
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$ con GABA y padsevonil	F1	6.29	80.99	3.71	-5.01±0.13
	C1	5.47	83.10	2.89	-4.93±0.13
	F1001	4.75	82.84	3.10	-4.57±0.14

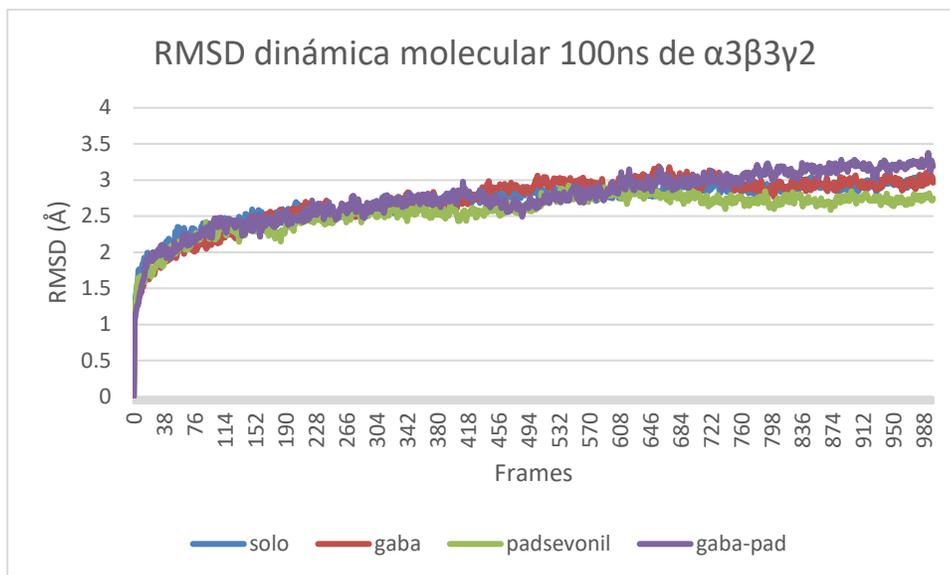


Figura 14. RMSD de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  con y sin ligandos.

Para el complejo  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ , en la figura 14 podemos observar que esta variante llega a un estado de convergencia a partir de los 70 ns en presencia y ausencia de ligandos.

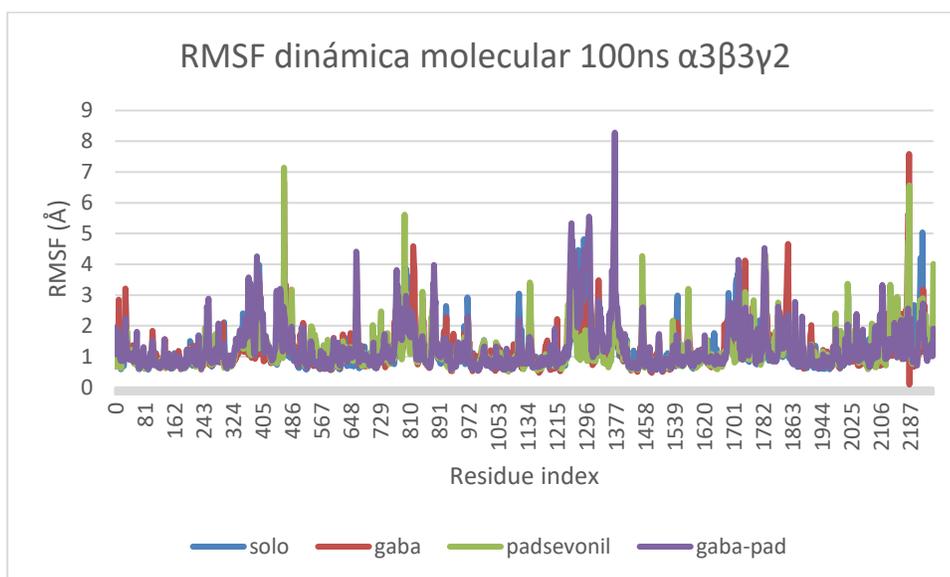


Figura 15. RMSF de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  con y sin ligandos.

La gráfica de RMSF de la figura 15 nos muestra los movimientos de los carbonos alfa de esta variante a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular, en presencia y ausencia de ligandos. Podemos observar que, en presencia de los ligandos el receptor presenta mayor cantidad de aminoácidos con mayor movimiento que en ausencia de ligandos. En el cuadro 22 se muestran los movimientos representativos de cada subunidad de cada experimento estudiado para este complejo. En esta variante también encontramos coincidencias de residuos (marcados con amarillo); por ejemplo, para la cadena A, el residuo SER397 para el pentámero solo, con GABA y con GABA y padsevonil, SER398 para el pentámero solo y con GABA, PRO400 para el pentámero con GABA y con GABA y padsevonil, THR401 para el pentámero solo y con GABA; para la cadena B, VAL199 para el pentámero con GABA, con padsevonil, y con GABA y padsevonil, ALA201 y 202 para el pentámero con GABA y el pentámero con padsevonil, SER333 y 336 para el pentámero solo y con padsevonil, LYS413 para el pentámero con GABA y el pentámero con GABA y padsevonil, ILE414 para el pentámero con GABA y el pentámero con padsevonil; para la cadena C, el residuo GLY343 para el pentámero solo, con GABA, y con GABA y padsevonil, LYS345 para el pentámero con padsevonil y con GABA y padsevonil, VAL346 para el pentámero con GABA y el pentámero con padsevonil, LYS353 para el pentámero con GABA y con GABA y padsevonil, TYR375 y PRO376 para el pentámero solo y con GABA, LEU379 para el pentámero solo y con GABA y padsevonil, LYS390 para el pentámero solo y con GABA; para la cadena D, ILE414 para el pentámero solo, con GABA y con GABA y padsevonil; y para la cadena G, ASP192 y VAL312 para el pentámero solo y con padsevonil, HIS396 para el pentámero solo, con GABA, y el pentámero con padsevonil. Los residuos que coinciden en movimientos de la cadena A (subunidad alfa) corresponden al segmento citoplasmático de la subunidad, los residuos de la cadena B (subunidad beta) corresponden al segmento extracelular y al citoplasmático de dicha subunidad, los de la cadena C (subunidad alfa) al segmento transmembranal 3 y al segmento citoplasmático de la subunidad, los de la cadena D (subunidad beta) al segmento citoplasmático de la subunidad, y los de la cadena G (subunidad gama) al segmento extracelular, al segmento transmembranal 2 y al

segmento citoplasmático de la subunidad.

Cuadro 22. Movimientos representativos de la variante  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  con y sin ligandos.

$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ solo			$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con GABA			$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con padsevonil			$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con GABA y padsevonil				
Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)	Cadena	Residuo	RMSF (Å)		
A	PRO394	3.15	A	PRO400	2.61	A	GLU384	2.09	A	PRO257	2.88		
	PRO395	3.41		SER397	3.43		VAL199	2.48		CYS258	2.42		
	SER397	3.98		SER398	3.16		ALA201	3.42		ASN369	2.85		
	SER398	3.57		THR401	2.52		THR202	3.42		THR367	3.50		
	THR401	2.37		VAL199	2.01		ALA318	2.08		ILE370	2.94		
	GLY459	2.63		ALA201	2.88		GLU322	4.70		GLY391	4.25		
	SER329	2.70		ALA202	2.79		SER333	5.62		SER397	3.44		
B	GLU332	2.61	B	ILE305	2.14	B	ARG355	2.54	A	PRO400	2.96		
	SER333	2.85		LEU343	2.33		VAL336	3.11		VAL445	3.14		
	VAL336	3.27		VAL349	2.88		MET382	3.11		TYR450	2.72		
	ASN341	3.42		GLU355	3.52		LYS413	2.74		ALA456	2.95		
C	ASN200	3.05	C	SER357	4.59	C	ILE414	2.91	B	VAL199	3.19		
	GLY343	2.17		GLY361	2.58		SER230	3.41		GLY308	2.33		
	LYS362	3.31		LYS413	2.48		ARG228	2.56		GLY310	3.47		
	SER365	3.38		ILE414	2.72		TRP339	3.81		ARG313	3.17		
	THR373	2.45		VAL346	3.16		GLU342	4.35		ALA338	2.77		
	TYR375	3.64		GLY343	3.53		GLY343	3.57		LYS411	2.64		
	PRO376	3.97		GLU351	2.21		LYS345	3.36		LYS413	3.17		
	ASN378	3.49		LYS353	2.75		VAL346	2.85		ASP416	3.25		
	LYS381	4.01		LYS354	3.01		GLU417	2.39		GLU342	4.41		
	ASP382	4.49		THR356	2.48		THR202	3.20		GLY343	4.94		
	LEU379	4.82		VAL371	2.73		ASN341	2.43		LYS345	4.70		
	LYS390	3.65		TYR375	2.11		ASP192	3.36		GLU348	3.33		
	ALA392	2.61		PRO376	2.00		VAL312	2.95		GLU351	3.77		
ARG462	3.48	ASP382	2.17	ASN354	2.26	LYS353	4.38						
LYS363	3.36	LYS390	2.30	HIS357	3.11	PRO357	3.72						
D	GLY171	2.83	D	ALA396	2.75	G	GLN359	4.75	C	LEU379	4.34		
	ASP172	2.99		GLU417	2.95		ASP362	6.56		PHE385	3.78		
	PRO311	2.04		THR420	3.30		ARG391	2.83		ALA393	5.56		
	LYS320	2.68		MET460	2.75		ARG394	2.21		ALA322	2.34		
	ILE342	3.89		GLY308	2.08		HIS396	2.84		ASP337	2.38		
	LEU344	3.10		ARG309	2.17		G	D		ASN341	3.42		
	THR345	2.51		GLY358	4.12					ILE414	3.79		
ILE412	4.06	GLY359	3.89	LYS411	4.53								
ILE414	3.06	GLY361	2.23	THR281	2.34								
ASP192	2.47	ILE414	4.18	LEU287	3.05								
THR193	2.44	PRO415	3.58	LEU287	3.05								
G	VAL312	2.47	G	VAL302	2.40	G			D	G	D	G	D
	PRO326	2.26		ALA338	2.35		D						
	SER327	2.39		MET352	2.46			D					
				ALA355	2.77								

TRP390	2.24	HIS357	3.98
ARG391	2.92	GLN359	5.63
GLY393	4.21	ASP362	10.09
<b>HIS396</b>	3.42	GLU363	2.93
ILE394	3.50	<b>HIS396</b>	2.33
		ILE399	2.65
		SER404	2.65

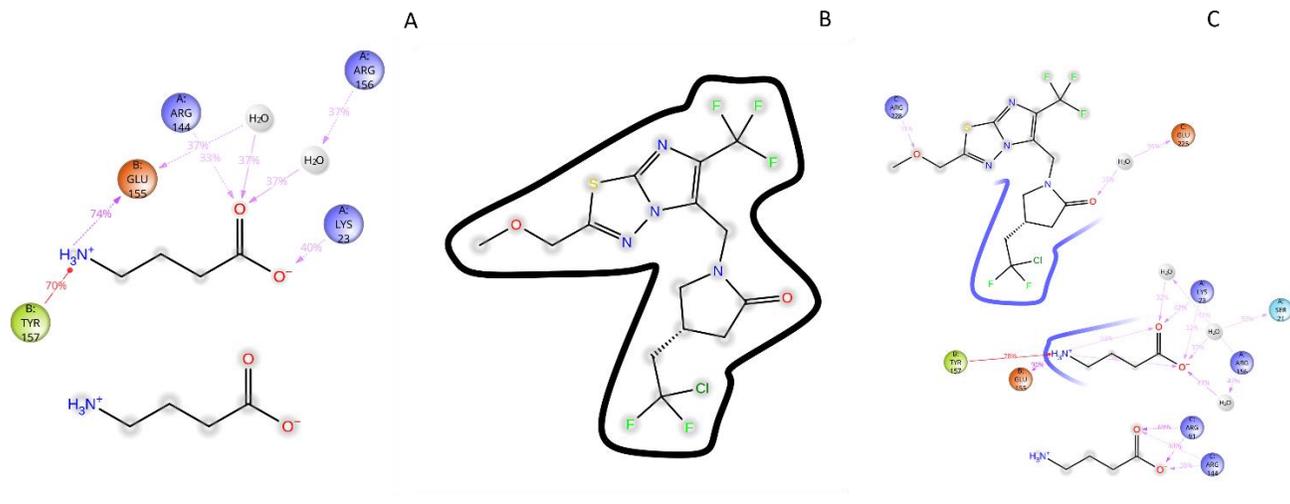


Figura 16. Diagrama de interacciones proteína-ligando de las dinámicas moleculares de 100ns del pentámero  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  con ligandos.

La sección A de la figura 16 corresponde a la dinámica molecular 100ns del pentámero  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  con los ligandos GABA, donde solo interactúa uno de los ligandos formando puentes de hidrógeno con los residuos LYS23, ARG144 y ARG156 de la cadena A, GLU155 y **TYR157** de la cadena B. La sección B corresponde a la dinámica con padsevoniol, el cual no forma interacciones con el receptor, y podemos apreciar como la molécula está expuesta con el disolvente. La sección C corresponde a la dinámica de GABA con padsevoniol, donde los ligandos GABA forman puentes de hidrógeno con los residuos SER21, LYS23 y ARG156 de la cadena A, GLU155 y **TYR157** de la cadena B, ARG91 y ARG144 de la cadena C. Padsevoniol interactúa con GLU225 y ARG228 de la cadena G.

El residuo TYR157 de la cadena que forman interacciones con los ligandos GABA en la sección A y C (que corresponden a subunidades beta) son aminoácidos

importantes para la unión de GABA reportados en la bibliografía (Mehta y Ticku, 1999). El resto de las interacciones encontradas en los experimentos para esta variante no se han reportado como relevantes en la bibliografía. Para obtener la conformación más representativa de la trayectoria se usó el módulo *Desmond Trajectory Clustering* en Maestro. En el cuadro 23 podemos apreciar que en los experimentos del pentámero solo y con GABA, encontramos sus estructuras representativas cercanas al inicio de la simulación, con 46.9 y 27.8 ns respectivamente, mientras que para los experimentos del pentámero con padsevonil y GABA con padsevonil encontramos sus estructuras representativas casi en la última cuarta parte de la simulación, a los 85.5 y 71.9 ns respectivamente.

Cuadro 23. Elección del cluster representativo del pentámero  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ .

Experimento	Frecuencia	Total de clústeres	Total de conformaciones en cada clúster	Frame	Tiempo
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ solo	5	38	15, 12 y 11	470	46.9 ns
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con GABA	9	38	16, 13 y 9	279	27.8 ns
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con padsevonil	8	30	17 y 30	856	85.5 ns
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con GABA y padsevonil	9	37	15, 12 y 10	720	71.9 ns

Cuadro 24. Calidad del pentámero  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  a diferentes tiempos.

Experimento	Tiempo	Rotámeros aceptables (%)	Ramachandran favorecidos (%)	Ramachandran atípicos (%)	Z-score
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ solo	F1	6.12	80.64	4.87	-5.18±0.13
	C1	5.12	83.44	3.71	-4.94±0.13
	F1001	5.67	81.21	3.30	-4.88±0.14
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con GABA	F1	7.31	82.01	4.33	-4.82±0.14
	C1	5.82	82.77	3.48	-4.73±0.14
	F1001	5.52	82.63	3.66	-4.89±0.14
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con padsevonil	F1	6.07	82.54	4.06	-4.82±0.14
	C1	4.93	82.81	4.06	-4.76±0.14
	F1001	4.93	82.86	3.88	-4.89±0.13
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$ con GABA y padsevonil	F1	6.67	81.92	3.88	-5.02±0.14
	C1	5.27	84.29	2.68	-4.67±0.14
	F1001	5.67	83.17	3.39	-4.66±0.14

### 5.3 Cuantificación del efecto de la unión de los ligandos selectos a la estructura del receptor.

#### 5.3.1 Determinación de la apertura del canal iónico GABA<sub>A</sub> en presencia o ausencia de ligandos.

Cuadro 25. Diferencias de áreas del análisis de apertura del poro a lo largo de la dinámica molecular de 100ns.

Variante	Solo (Å <sup>2</sup> )	Con GABA (Å <sup>2</sup> )	Con padsevonil (Å <sup>2</sup> )	Con GABA y padsevonil (Å <sup>2</sup> )
α <sub>1</sub> β <sub>2</sub> γ <sub>2</sub>	23.34	119.14	38.92	95.31
α <sub>2</sub> β <sub>3</sub> γ <sub>2</sub>	39.99	336.54	64.74	149.55
α <sub>3</sub> β <sub>2</sub> γ <sub>2</sub>	-5.34	43.433	31.14	29.77
α <sub>3</sub> β <sub>3</sub> γ <sub>2</sub>	197.86	102.34	-7.81	233.62

Considerando que el receptor GABA<sub>A</sub> forma un pentámero, y que en la presencia de agonistas este debería abrirse (aumentar su área superficial), se calcularon las distancias entre los segmentos transmembranales dos entre cada subunidad adyacente, pues se ha demostrado que el movimiento de este segmento forma la permeabilidad del poro para el paso de los iones cloruro (Chuang y Reddy, 2018), para posteriormente calcular el área del poro a lo largo de la trayectoria de la dinámica, y finalmente observar las diferencias entre las áreas iniciales y finales del receptor en ausencia y presencia de los ligandos seleccionados, y con esto poder concluir si el comportamiento del poro corresponde a una apertura (cuando dicha diferencia de áreas sea positiva), o a un cierre (cuando dicha diferencia de áreas sea negativa).

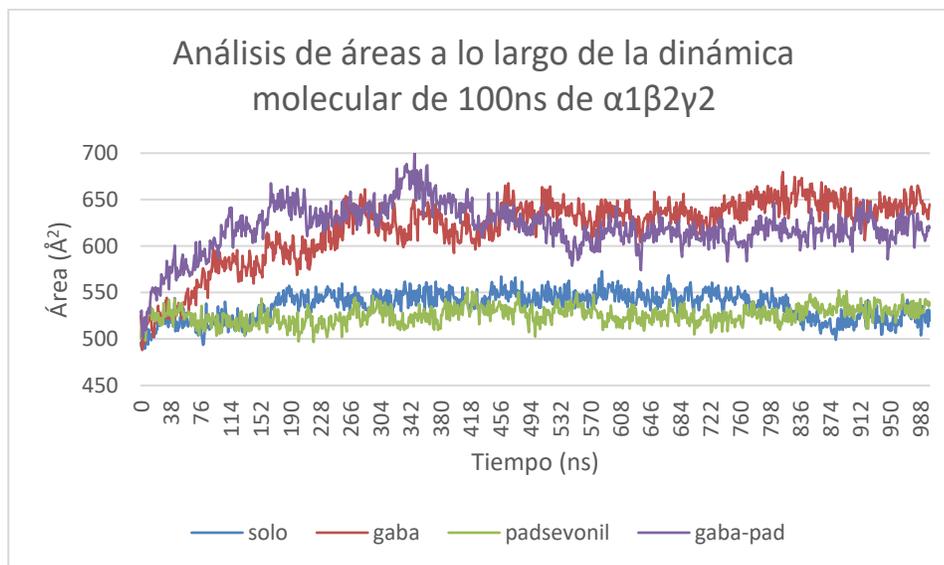


Figura 17. Análisis de áreas del pentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  en ausencia y presencia de ligandos.

Podemos observar en la figura 17 que el área del pentámero se mantiene con cambios poco significativos durante la dinámica en ausencia de ligandos y en presencia de padsevonil. Podríamos decir que hay “puntos de máxima apertura” (ver cuadro 26) refiriéndonos al área máxima de apertura que alcanza el poro durante la dinámica, siendo para este caso un área de 572.93 y 552.38  $\text{\AA}^2$  en los experimentos del pentámero solo y con padsevonil respectivamente. Por otro lado, si observamos el comportamiento de las líneas correspondientes a GABA y GABA con padsevonil, aparentemente el receptor comienza a abrirse desde los 0 ns hasta los 20 ns, para posteriormente mantenerse abierto durante el resto de la trayectoria, obteniendo puntos de máxima apertura de 679.76 y 688.48  $\text{\AA}^2$ , respectivamente. Con ello podríamos concluir que esta variante necesita de la presencia de su ligando natural para poder mantenerse en un estado abierto. Ahora bien, si comparamos los estados iniciales y finales del receptor en cada uno de sus experimentos (cuadro 24) se observa que la diferencia de áreas del poro en ausencia de ligandos y con padsevonil es muy similar (23.34  $\text{\AA}^2$  y 38.92  $\text{\AA}^2$ , respectivamente). Sorprendentemente, cuando el poro se encuentra con GABA y GABA con padsevonil, su diferencia de apertura (119.14 y 95.317  $\text{\AA}^2$ , respectivamente) es hasta 5 y 4 veces mayor (se abre más) que cuando está solo, y se mantiene así durante el resto de la trayectoria. Por último,

podemos observar que cuando el receptor está en presencia de GABA con padsevonil, mantiene un momento de “máxima apertura”, es decir, el momento en el que el poro alcanza su máxima apertura para posteriormente comenzar a cerrarse un poco, pero no por completo. Este fenómeno podemos observarlo para estos experimentos que acontece entre los 68 a los 91 ns de la dinámica para GABA, y de los 15 a los 40 ns de la dinámica para GABA con padsevonil. El hecho de que el receptor no tenga una apertura tan grande cuando se encuentra sólo con padsevonil concuerdan con lo reportado la bibliografía (Niespodziany y col., 2020), ya que se sabe que se necesita de la presencia de GABA para que dicho fármaco cumpla con su efecto.

Cuadro 26. Áreas en los puntos máximos de apertura del poro a lo largo de la dinámica molecular de 100ns.

Variante	Solo (Å <sup>2</sup> )	Con GABA (Å <sup>2</sup> )	Con padsevonil (Å <sup>2</sup> )	Con GABA y padsevonil (Å <sup>2</sup> )
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	572.93	679.76	552.38	688.48
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	3390.69	3586.90	3165.49	3258.23
$\alpha_3\beta_2\gamma_2$	521.00	537.77	545.47	521.80
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	3616.19	3523.68	3417.14	3580.55

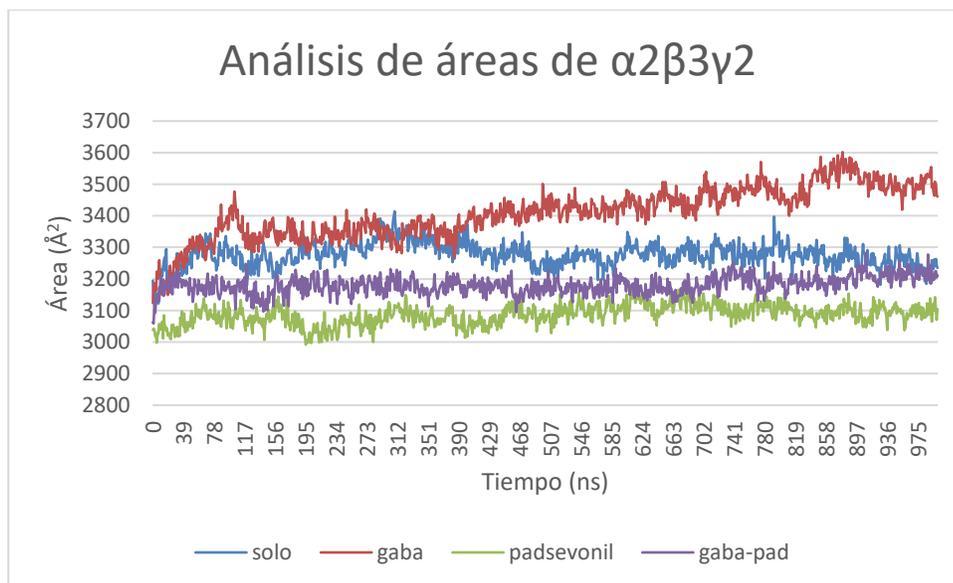


Figura 18. Análisis de áreas del pentámero  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  en ausencia y presencia de ligandos.

Podemos ver en la figura 18 que esta variante en ausencia de ligandos mantiene un comportamiento muy neutral a lo largo de la simulación, con una diferencia de áreas de  $39.99 \text{ \AA}^2$  y un punto de máxima apertura de  $3390.69 \text{ \AA}^2$ . En presencia de GABA el poro alcanza su estado de máxima apertura de los 80 a los 93 ns de la dinámica con un área de máxima apertura de  $3586.90 \text{ \AA}^2$ , y con una diferencia de áreas de  $336.55 \text{ \AA}^2$ , 8 veces más que en ausencia de ligando. En presencia de padsevonil el receptor también adopta un comportamiento neutral, con un área de máxima apertura de  $3165.49 \text{ \AA}^2$ , y una diferencia de áreas de  $64.74 \text{ \AA}^2$ , mucho menor que en presencia de GABA. Por otro lado, podemos observar que en presencia de GABA con padsevonil el receptor también adopta un comportamiento muy neutral a lo largo de la dinámica y no se aprecia claramente un momento de máxima apertura, siendo su área de máxima apertura de  $3258.23 \text{ \AA}^2$ , y con una diferencia de áreas de  $149.55 \text{ \AA}^2$ , casi 4 veces mayor que cuando el receptor se encuentra solo. Podemos concluir que esta variante no es tan sensible a GABA con padsevonil en comparación a su comportamiento en presencia de GABA. Aun así, es necesaria la unión de GABA para que el poro tenga una apertura significativa cuando también se una padsevonil. La respuesta observada de esta variante con padsevonil puede deberse a que las variantes de este receptor que contienen la subunidad  $\alpha_2$  son menos sensibles en su sitio a benzodiazepinas en comparación con aquellos receptores que contienen la subunidad  $\alpha_1$  y  $\alpha_5$  (Niespodziany y col., 2020).

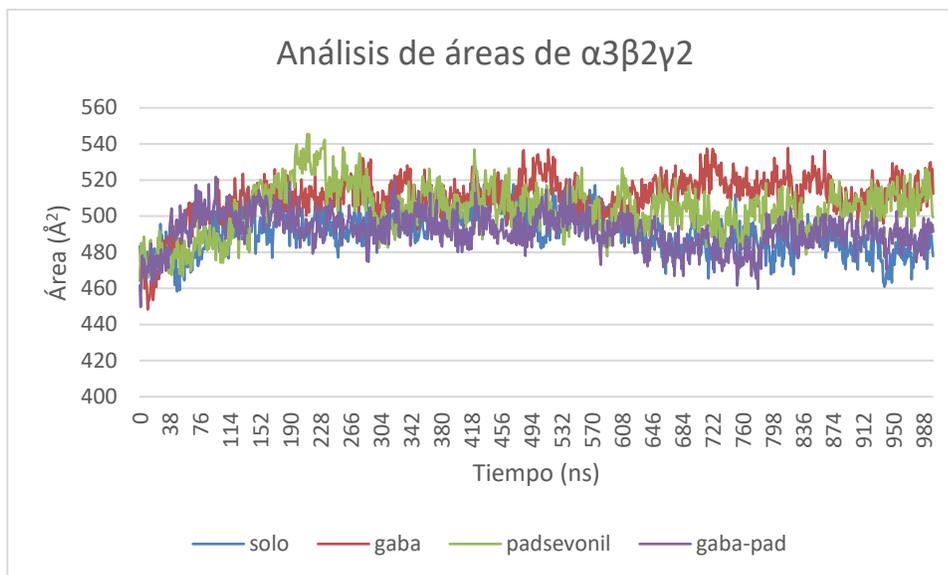


Figura 19. Análisis de áreas del pentámero  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  en ausencia y presencia de ligandos.

En la figura 19 podemos ver que, cuando el receptor se encuentra solo, éste tiene una diferencia de áreas de  $-5.34 \text{ \AA}^2$ , ya que dicha diferencia es negativa podríamos decir que se cierra, y un punto de máxima apertura con un área de  $521.00 \text{ \AA}^2$ . En presencia de GABA podemos decir que tiene una zona de máxima apertura que va de los 40 a los 87 ns, alcanzando un área de  $537.77 \text{ \AA}^2$  en su punto de máxima apertura, y una diferencia de áreas  $43.43 \text{ \AA}^2$ . En presencia de padsevonil encontramos una zona de máxima apertura de los 10 a los 30 ns, alcanzando los  $545.47 \text{ \AA}^2$  de área en su punto de máxima apertura, y con una diferencia de áreas de  $31.14 \text{ \AA}^2$ . Cuando el receptor se encuentra con GABA y padsevonil podemos ver que hay un momento de máxima apertura de los 5 a los 60 ns, con un área en su punto de máxima apertura de  $521.80 \text{ \AA}^2$ , y los cambios posteriores a este momento son muy sutiles. La diferencia de áreas en este último caso es de  $29.77 \text{ \AA}^2$ , sutilmente menor al comportamiento del receptor con padsevonil. Aunque la diferencia de áreas sea mayor cuando el receptor se encuentra con padsevonil, podemos apreciar que en presencia de GABA con padsevonil el momento de máxima apertura del poro es muy prolongado. Para esta variante podríamos decir que su baja respuesta a padsevonil pudiera deberse a que la subunidad alfa corresponde a  $\alpha_3$  y se ha

encontrado que los receptores con esta variante son menos sensibles a padsevonil (Niespodziany y col., 2020).

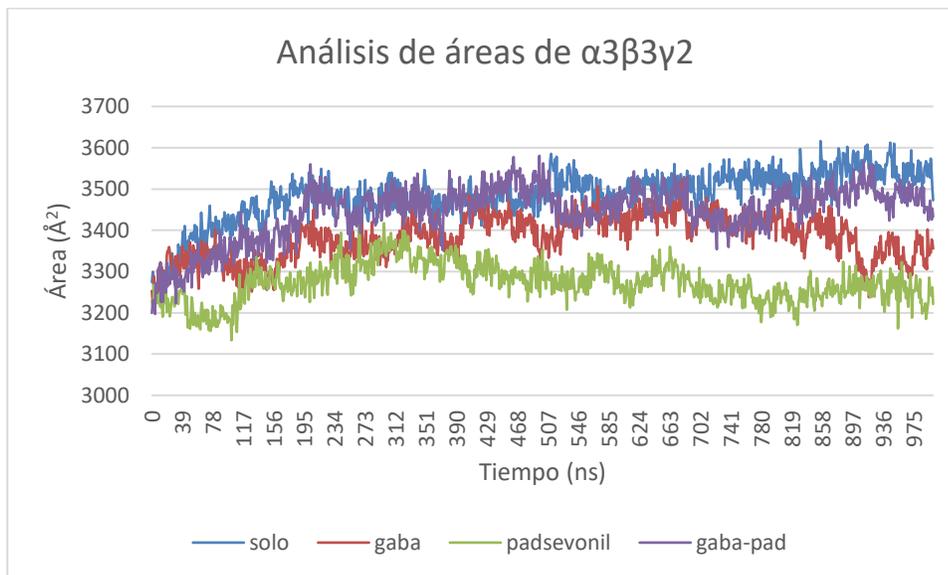


Figura 20. Análisis de áreas del pentámero  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  en ausencia y presencia de ligandos.

En la figura 20 podemos observar que el receptor requiere de más tiempo para incrementar su área en comparación con las otras variantes en los distintos experimentos que se muestran. Cuando se encuentra solo, se toma hasta 19 ns para hacerlo, pero es hasta los últimos 20 ns de la trayectoria en que presenta su momento de máxima apertura, con un área de máxima apertura de  $3616.19 \text{ \AA}^2$ , y obtiene una diferencia de áreas de  $197.86 \text{ \AA}^2$ . En presencia de GABA podemos observar que esta variante mantiene un comportamiento de pulsaciones, pues aparenta abrirse y cerrarse constantemente durante toda la dinámica. Su momento de máxima apertura se encuentra de los 39 a los 90 ns, alcanzando un punto de máxima apertura con un área de  $3523.68 \text{ \AA}^2$ . Su diferencia de áreas es de  $102.34 \text{ \AA}^2$ , casi la mitad de la diferencia de la apertura cuando el receptor se encuentra solo. Cuando el receptor se encuentra con padsevonil podemos apreciar un momento de máxima apertura de los 10 a los 50 ns, alcanzando un área de máxima apertura de  $3417.14 \text{ \AA}^2$ , con una diferencia de áreas de  $-7.81 \text{ \AA}^2$ , es decir, se cierra. En el caso de GABA con

padsevonil podemos observar que el receptor también presenta un comportamiento de pulsaciones, y también presenta un momento de máxima apertura que va de los 19 a los 90 ns, alcanzando su punto de máxima apertura con un área de  $3580.55 \text{ \AA}^2$ , y una diferencia de áreas de  $233.62 \text{ \AA}^2$ , dos veces más que cuando el receptor se encuentra con GABA.

Podemos ver que, para esta variante, su actividad de apertura es mayor cuando se encuentra solo en comparación cuando se encuentra con ligandos. Por otro lado, cuando el receptor se encuentra en presencia de padsevonil su apertura es menor que cuando se encuentra con GABA y padsevonil, lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía, ya que se sabe que el receptor necesita de la presencia de GABA para que padsevonil haga su efecto (Niespodziany y col., 2020).

#### **5.4. Análisis global**

En el caso del heteropentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , cuando el pentámero se encuentra con ligandos, su RMSD se estabiliza más rápido que en ausencia (15 ns vs 70 ns), y presenta menos giros en su RMSF en presencia que en ausencia de GABA. En cuanto a las coincidencias de movimientos de residuos en cada experimento, los de la cadena A, B, C y G corresponden a residuos del dominio citoplasmático de cada subunidad, y los de la cadena D corresponden al dominio extracelular de dicha subunidad. En los diagramas de interacciones proteína-ligando nuestras moléculas a pesar de formar interacciones, estas no se han reportado como relevantes. El comportamiento del área del poro se comporta de manera similar cuando el pentámero está solo y con padsevonil, en cambio podemos decir que en presencia de GABA y padsevonil con GABA el área del poro aumenta, teniendo áreas de máxima apertura de  $679.76$  y  $688.48 \text{ \AA}^2$ , respectivamente, y una diferencia de áreas de  $119.14$  y  $95.317 \text{ \AA}^2$ , respectivamente, 5 veces mayor que cuando se encuentra solo ( $23.34 \text{ \AA}^2$ ) y y 4 veces mayor que cuando está con padsevonil ( $38.92 \text{ \AA}^2$ ).

Para la variante  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ , podemos decir que su RMSD se mantiene más estable cuando está solo que en presencia de ligandos. En cuanto a su RMSF podemos decir que en presencia de GABA y de GABA con padsevonil el receptor presenta mayor movimiento que cuando el receptor se encuentra solo o con padsevonil. Los

aminoácidos que coinciden en los distintos experimentos pertenecen a distintas zonas, como, los de la cadena A a los segmentos transmembrales 3 y 4, los de la cadena B corresponden al segmento extracelular y al segmento transmembranal 3, los de la cadena C y D al segmento citoplasmático y el segmento transmembranal 3, y los residuos de los de la cadena G al segmento citoplasmático. En los diagramas de interacciones proteína-ligando pudimos ver que GABA forma interacciones con TYR157 y TYR205 de la cadena B y D, las cuales se han reportado como importantes para la unión de GABA a su receptor. El comportamiento del área del poro en ausencia de ligandos y con padsevonil y es muy neutral a lo largo de la dinámica, en cambio cuando el receptor se encuentra con GABA podemos ver que su incremento de área es más drástico, pues alcanza un área de máxima apertura de  $3586.90 \text{ \AA}^2$  y una diferencia de áreas de  $336.55 \text{ \AA}^2$ ; cuando se encuentra con GABA y padsevonil su comportamiento también es bastante neutral con un área de máxima apertura de  $3258.23 \text{ \AA}^2$ , y con una diferencia de áreas de  $149.55 \text{ \AA}^2$ , casi 4 veces mayor que cuando el receptor se encuentra solo. Esta variante no es tan sensible a GABA con padsevonil en comparación a su comportamiento en presencia de GABA, aun así, es necesaria la unión de GABA para que el poro tenga una apertura significativa cuando también se una padsevonil.

La variante  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  estabilizó su RMSD más rápido que cuando se encuentra con ligandos (30 vs 60 ns). Su RMSF presentó mayor número de movimientos cuando se encuentra sin ligandos. Los residuos que coinciden en los distintos experimentos de esta variante, en la cadena A, C, D y G corresponden al segmento citoplasmático de cada subunidad, y los residuos de la cadena B al segmento extracelular de la subunidad. Las interacciones observadas para los experimentos de esta variante no se han reportado como relevantes en la bibliografía. Hablando del comportamiento del área del poro pudimos observar en cuando se encuentra solo se cierra, pues obtiene una diferencia de áreas de  $-5.34 \text{ \AA}^2$ . En presencia de ligandos, el poro se abre, con una diferencia de áreas de  $43.43 \text{ \AA}^2$  y una máxima apertura de  $537.77 \text{ \AA}^2$  cuando se encuentra con GABA,  $31.14 \text{ \AA}^2$  y  $545.47 \text{ \AA}^2$  cuando se encuentra con padsevonil, y  $29.77 \text{ \AA}^2$  y  $521.80 \text{ \AA}^2$  en presencia de GABA con padsevonil, además de que se observó un momento de máxima apertura más prolongado (55 ns).

Por último, la variante  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  llegó a un estado de convergencia en su RMSD de igual manera sin importar la presencia o ausencia de ligandos. El RMSF mostró que en presencia los ligandos el receptor presentó mayor cantidad de aminoácidos con mayor movimiento que en ausencia de ligandos. Los residuos que coincidieron en movimientos de la cadena A corresponden al segmento citoplasmático de la subunidad, los residuos de la cadena B corresponden a los segmentos extracelular y al citoplasmático de la subunidad, los de la cadena C al segmento transmembranal 3 y al segmento citoplasmático, los residuos de la cadena D al segmento citoplasmático de la subunidad, y los de la cadena G al segmento extracelular, al segmento transmembranal 2 y al segmento citoplasmático de la subunidad. En los diagramas de interacción proteína-ligando se observó la interacción de GABA con TYR157, la cual se ha reportado como importante para la unión de dicho ligando. En cuanto al comportamiento del área del poro pudimos observar que a esta variante le cuesta más tiempo para incrementar su área en todos los experimentos. Cuando se encuentra solo alcanzó un área de máxima apertura de  $3616.19 \text{ \AA}^2$  y una diferencia de áreas de  $197.86 \text{ \AA}^2$ , en presencia de GABA alcanza un área de máxima apertura de  $3523.68 \text{ \AA}^2$  y una diferencia de áreas de  $102.34 \text{ \AA}^2$ ; cuando se encuentra con padsevonil podemos apreciar un área de máxima apertura de  $3417.14 \text{ \AA}^2$  y una diferencia de áreas de  $-7.81 \text{ \AA}^2$ , es decir, se cierra; en el caso de GABA con padsevonil alcanza un área de máxima apertura de  $3580.55 \text{ \AA}^2$ , y una diferencia de áreas de  $233.62 \text{ \AA}^2$ , dos veces más que cuando el receptor se encuentra con GABA.

## 6. CONCLUSIONES

Se construyeron los modelos computacionales de 4 variantes del receptor GABAA, cuyo control de calidad demostró que los modelos por homología no fueron apropiados para cálculos posteriores, mejorando su calidad por medio de simulaciones de dinámica molecular.

Por acoplamiento molecular se identificó el modo de unión de los ligandos GABA y padsevonil, identificándose además de formar algunas interacciones relevantes coincidentes con las interacciones reportadas, con lo que se consideró como validado el proceso de acoplamiento molecular.

Mediante simulaciones de dinámica molecular, observamos cambios conformacionales del receptor GABA<sub>A</sub> inducidos por la unión de GABA y padsevonil, expresados como el aumento del área del poro, pero de diferente forma dependiendo de la variante:

- El heteropentámero  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  en presencia de GABA y GABA con padsevonil estabiliza su RMSD en menor tiempo, presenta menos giros en su RMSF y estos corresponden a movimientos de residuos de los dominios citoplasmáticos y extracelular, además de que el área del poro presenta un comportamiento de apertura durante las simulaciones, en comparación a los experimentos del pentámero solo o con padsevonil.
- La variante  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  estabiliza su RMSD en menor tiempo cuando se encuentra en ausencia de ligandos, así como menos giros en su RMSF cuyos residuos corresponden al segmento citoplasmático, transmembranal 3 y citoplasmático del receptor; adicionalmente, se formaron interacciones con GABA reportadas como relevantes en la bibliografía y el comportamiento del área del poro es de apertura en presencia de GABA y GABA con padsevonil, en comparación con el comportamiento neutro que mostró al estar solo o con padsevonil.
- La variante  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  cuando se encuentra sola estabiliza su RMSD más rápido y presentó mayor número de movimientos en su RMSF con

residuos que corresponden al segmento citoplasmático y extracelular del receptor. Particularmente esta variante disminuye el área de su poro en ausencia de ligandos, pero se abre en el resto de los experimentos.

- La variante  $\alpha_3\beta_3\gamma_2$  no demuestra comportamiento particular en su RMSD en los distintos experimentos, por otro lado, su RMSF aumenta en presencia de ligandos y los residuos que coinciden en los experimentos corresponden a los segmentos extracelular, transmembranal 2 y 3, y citoplasmático del receptor. Se observó una interacción reportada como relevante para la unión de GABA. Se observó un comportamiento de apertura del poro en presencia de GABA y GABA con padsevoniil, y se cerró en presencia de padsevoniil.

## 7. REFERENCIAS

- Aguilera-Durán G.** Estudio computacional de blancos moleculares relevantes en vitiligo: activación de los receptores CXCR3 y CXCR6, y modulación alostérica de la tirosinasa. Universidad Autónoma de Querétaro, **2021**.
- Alegría-González C.** Evaluación in silico de la interacción del cannabidiol con dianas biológicas relacionadas con la epilepsia. Universidad Autónoma de Querétaro, **2019**.
- Bhagat K**, Singh J V., Pagare PP, Kumar N, Sharma A, Kaur G, Kinarivala N, Gandu S, Singh H, Sharma S, Bedi P. Rational approaches for the design of various GABA modulators and their clinical progression. Springer International Publishing, **2020**;25:551-601.
- Bialer M**, Johannessen S, Koepp M, Levy R, Perucca E, Tomson T, White S. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Fourteenth Eliat Conference on New Antiepileptic Drugs and Devices (EILAT XIV). II. Drugs in more advanced clinical development. *Epilepsia*. **2018**;59:1842-1866.
- Bormann J.** The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **2000**;21:16–9.
- Bowers K**, Chow E, Xu H, Dror R, Eastwood M, Gregersen B, Klepeis J, Kolossvary I, Moraes M, Sacerdoti F, Salmon J, Shan Y, Shaw D. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *IEEE*, **2006**.
- Braat S**, Frank-Kooy R. The GABA<sub>A</sub> receptor as a therapeutic target for neurodevelopmental disorders. *Cell Press*, **2015**;86:1119-1130
- Butler K**, Moody O, Schuler E, Coryell J, Alexander J, Jenkins A, Escayg E. De novo variants in GABRA2 and GABRA5 alter receptor function and contribute to early-onset epilepsy. *Brain*, **2018**;141:2392–2405.
- Calixto E.** GABA withdrawal syndrome: GABA a receptor , synapse , neurobiological implications and analogies with other abstinences. *Neuroscience*, **2016**;313:57-72.
- Chen X**, Gerven J Van, Cohen A, Jacobs G. Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. *Acta Pharmacol Sin*, **2019**;40:571–82.

**Cheng T**, Wallace D, Ponteri B, Tuli M. Valium without dependence? Individual GABA<sub>A</sub> receptor subtype contribution toward benzodiazepine addiction, tolerance, and therapeutic effects. *Neuropsychiatr Dis Treat*, **2018**;14:1351–61.

**Chuang S**, Reddy D. Genetic and molecular regulation of extrasynaptic GABA-A receptors in the brain: therapeutic insights for epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*, **2018**;364:180–197.

**Contreras-García I**, Cárdenas-Rodríguez N, Romo-Mancillas A, Bandala C, Zamudio S, Gómez-Manzo S, Hernández-Ochoa B, Mendoza-Torreblanca J, Pichardo-Macías L. Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems. *Pharmaceuticals*, **2022**;15,445.

**Dämgen M**, Biggin P. Computational methods to examine conformational changes and ligand-binding properties: Examples in neurobiology, *NeurosciLett*, **2019**;700:9-16.

**de Ruyck J**, Brysbaert G, Blossey R, Lensink M. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Adv Appl Bioinforma Chem*, **2016**;9:1–11.

**Floudas C**, Fung H, McAllister S, Mönnigmann M, Rajgaria R. Advances in protein structure prediction and de novo protein design: A review. *Chem Eng Sci*, **2006**;61:966–988.

**Frey B y Dueck D**. Clustering by Passing Messages Between Data Points. *Science*, **2007**;315:972-976.

**Gawehn E**, Hiss J, Schneider G. Deep Learning in Drug Discovery. *Mol Inform*, **2016**;35:3–14.

**Ghit A**, Assal D, Al-shami AS, Hussein D. GABA<sub>A</sub> receptors : structure , function , pharmacology , and related disorders. *Genetic Engineering and Biotechnology*, **2021**;123,19:1-15

**Grinter S**, Zou X. Challenges, applications, and recent advances of protein- ligand docking in structure-based drug design. *Molecules*, **2014**;19:10150–76.

**Hoover W**. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distribution. *J Chem Phys*, **1985**;31:1695-1697.

**INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.** Nota Técnica Estadística de Defunciones Registradas de Enero a Agosto 2020, Enero **2021**.

**Jing-Qiong K.** Defects at the crossroads of GABAergic signaling in generalized genetic epilepsies. *Epilepsy Res*, **2017**;137:9–18.

**Kaeberle J.** Epilepsy Disorders and Treatment Modalities. *Chronic Dis Manag*, **2018**;33:342–4.

**Kim J, Gharpure A, Teng J, Zhuang Y, Howard R., Zhu S, Noviello C, Walsh Jr, Lindahl E, Hibbs R.** Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature*, **2020**;585:303-308.

**Leclercq K, Matagne A, Provins L, Klitgaard H, Kaminski R.** Pharmacological Profile of the Novel Antiepileptic Drug Candidate Padsevonil: Characterization in Rodent Seizure and Epilepsy Models, **2020**;372:11-20.

**Liu G, Slater N, Perkins A.** Epilepsy: Treatment options. *Clin Ther*, **2017**;39:1-10.

**Lorenz-Guertin J, Bambino M, Jacob T.**  $\gamma 2$  GABA<sub>A</sub>R trafficking and the consequences of human genetic variation. *Front Cell Neurosci*, **2018**;12:1-20.

**Maguire J, Stell B, Rafizadeh M, Mody I.** Ovarian cycle-linked changes in GABA<sub>A</sub> receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci*, **2005**;8:797–804.

**Maljevic S, Møller R, Reid C.** Spectrum of GABA A receptor variants in epilepsy. *Curr Opin Neurol*, **2019**;2:183–190.

**Martyna G, Tobias D, Klein M.** Constant pressure molecular dynamics algorithms. *J Chem Phys*, **1994**;101:253–257.

**Mehta A.K. y Ticku M.K.** An update on GABA<sub>A</sub> receptors. *Brain research reviews* 1999;29:196-217.

**Meldrum B, Rogawski, M.** Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. *Neurotherapeutics* **2007**;4:18–61.

**Mitsutake A, Nagai T, Takano H.** Relaxation mode analysis for simulations of biomolecules, **2013**;1637:164102.

**Niespodziany I, Ghisdal P, Mullier B, Wood M, Provins L, Kaminski R, Wolff C.** Functional characterization of the antiepileptic drug candidate, padsevonil, on GABA<sub>A</sub>

receptors. *Epilepsia*. **2020**;61:914-923.

**Nosé S.** A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J Chem Phys*, **1984**;81:511–9.

**OMS. Organización Mundial de la Salud.** *Epilepsia. Datos y cifras*, Junio **2019**. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>

**OMS. Organización Mundial de la Salud.** *Medidas mundiales contra la epilepsia y otros trastornos neurológicos.* Noviembre **2020**. Recuperado de: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA73/A73\\_R10-sp.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA73/A73_R10-sp.pdf)

**Organización Panamericana de la Salud.** *El abordaje de la epilepsia desde el sector de la salud pública*, **2018**. Recuperado de: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49509/epilepsia\\_espan%CC%83ol\\_OK.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49509/epilepsia_espan%CC%83ol_OK.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

**Riney K,** Bogacz A, Somerville E, Hirsch E. Classification and definition of epilepsy syndromes with onset at a variable age: position statement by the ILAE task force on nosology and definitions. *International League Against Epilepsy*, **2017**. Recuperado de: <https://www.ilae.org/files/dmfile/CHILDApril6withfigs.pdf>

**Roy A.** I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, **2005**;5:725–35.

**Rudolph U,** Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA A receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*, **2011**;10:685–697.

**Santos-Martins D,** Solis-Vasquez L, Tillack A, Sanner M, Koch A, Forli S. Accelerating Auto Dock 4 with GPUs and Gradient-Based Local Search. *J Chem Theory Comput*, **2021**;17:1060–73.

**Schrödinger,** Maestro. Schrödinger Release, **2019**. Recuperado de: <https://www.schrodinger.com/>

**Smart T,** Stephenson F. A half century of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *BrainNeurosci Adv*, **2019**;3:1–9.

**Sneha P,** Priya D. *Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine*, **2016**;102:1-32.

**Sobolev O,** Afonine P, Moriaty N, Hekkelman M, Joosten R, Perrakis A, Adams P. A

global Ramachandran score identifies protein structures with unlikely stereochemistry. *Structure*, **2020**;28,11:1249-1258.

**Solomon V**, Tallapragada V, Chebib M, Johnston G, Hanrahan J. GABA allosteric modulators: an overview of recent developments in non-benzodiazepine modulators. *Eur J Med Chem*, **2019**;171:434–61.

**Sucher N**, Carles M. A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy Behav*, **2015**;52:1525-5050

**Szodorai E**, Bampali K, Romanov RA, Kasper S, Hökfelt T, Ernst M, Lubec G, Harkany T. Diversity matters: combinatorial information coding by GABA<sub>A</sub> receptor subunits during spatial learning and its allosteric modulation. *Cell Signal*, **2018**;50:142–159.

**UNIPROT**. The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, **2021**;49:D480-489.

**Williams C**, Headd J, Moriarty N, Prisant M, Videau L, Deis L, Verma V, Keedy D, Hintze B, Chen V, Jain S, Lewis S, Arendall W, Snoeyink J, Adams P, Lovell S, Richardson J, Richardson D. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*, **2018**;27:293-315.

**Wood M**, Daniels V, Provins L, Wolff C, Kaminski R, Gillard M. Pharmacological Profile of the Novel Antiepileptic Drug Candidate Padsevonil: Interactions with Synaptic Vesicle 2 Proteins and the GABA<sub>A</sub> Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2020**;372:1-10.

**Wu C**, Sun D. GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metab Brain Dis* **2015**;30:367–379

**Xu X**, Huang M, Zou X. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. *Biophys Reports*, **2018**;4:1–16.

**Yang J**, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods*, **2015**;12:7–8.

**You W**, Tang Z, Chang C. Potential Mean Force from Umbrella Sampling Simulations: What Can We Learn and What Is Missed? *J Chem Theory Comput*, **2019**;15:2433–43.

## 8. ANEXOS

C.U., Querétaro, octubre 29, 2021  
No. de oficio. CBQ21/122

**Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas**  
Facultad de Química  
Presente

**At'n. Ivonne Acosta Buitrón**

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado "**Estudio computacional de variantes del receptor GABA<sub>a</sub> unido con ligandos selectos para el diseño de nuevos fármacos antiepilépticos**", del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **exento**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.



Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez  
**Presidente**



M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez  
**Representante investigador**

Ccp archivo