

Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Neurobiología



Modulación alostérica del Receptor de Glicina por Resveratrol

NICOLE ANDREA SCARLET ESPINOZA RUBILAR

Tesis presentada a la escuela de graduados de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Magíster en Neurobiología

Tutor: Dr. Gustavo Moraga Cid
Co-Tutor: Dr. Carlos Felipe Burgos Arias

**Laboratorio de Neurofarmacología
Departamento de Fisiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción**

Comisión evaluadora: Dr. Patricio Castro Maldonado
Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso
Dr. Elías Leiva Salcedo

CONCEPCIÓN, CHILE
-2023-

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

Profesores integrantes del comité evaluador.

Profesor Guía

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

Profesor Co-Guía

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

Comisión Evaluadora

Dr. Patricio Castro Maldonado
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Elías Leiva Salcedo
Universidad de Santiago de Chile

Director Subrogante Programa

Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

Para mi madre Andrea.

Que su alegría y espíritu
joven jamás desaparezcan.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de mi tutor, el Dr. Gustavo Moraga Cid quien ha demostrado no solo un gran conocimiento, sino también ha sido un guía constante. A mi Co-tutor, el Dr. Carlos Felipe Burgos Arias, por la constante motivación para avanzar en los objetivos de esta tesis. Gracias por permitirme trabajar en sus laboratorios.

Agradezco también al proyecto FONDECYT 1211095 que permitió desarrollar y finalizar este trabajo.

De igual manera agradezco al equipo de laboratorio que me recibió, especialmente a David Flaig quien me entregó las principales herramientas para comenzar mi trabajo en el laboratorio. Del mismo modo, agradezco a Cesar Lara y Ana Marileo, por el apoyo, motivación y por entregarme todos sus conocimientos en el área de la electrofisiología. También agradezco a Victoria San Martín, Jessica Panes, Omayra Contreras y Scarlet Gallegos por entregarme palabras sabias en los momentos necesarios.

El proceso de tesis es un proceso largo que a veces parecía interminable, sin embargo, siempre existen personas especiales en nuestras vidas que hacen que este proceso sea más llevadero. Por este motivo, quiero agradecer a mi amiga, compañera, hermana Katherine Fariña Oliva quien posee una alegría y sabiduría indescriptibles, quien ha sido un apoyo emocional fundamental para finalizar esta tesis. Del mismo modo agradezco a mi amigo Gabriel González, quien siempre ha entregado su punto de vista y las palabras indicadas.

Con gran afecto quiero agradecer a mi familia. En especial a mi madre, gracias por siempre apoyarme en todos mis sueños y deseos, por siempre motivarme y nunca limitarme. También, quiero agradecer a mi pareja por siempre estar dispuesto a escucharme, aconsejarme, gracias por tu amor y paciencia eterna. Del mismo modo, quiero agradecer al pequeño Haru, quien ha llenado nuestro hogar de alegrías y travesuras. Agradezco a cada integrante de mi familia por la comprensión, compañía y especialmente por el amor brindado cada día.

Me permito finalizar este apartado con una frase de uno de mis libros favoritos.

“Todos tenemos luz y oscuridad en nuestro interior: lo que importa es qué parte decidimos potenciar” -Sirius Black-

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
Abreviaturas.....	xiv
Resumen	xvi
Abstract	xviii
INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades del receptor de glicina.....	1
2. Topología y estructura general del receptor de glicina.....	2
3. Modulación alostérica del receptor de glicina	4
4. Generalidades del Resveratrol	6
5. Modulación del receptor de glicina por resveratrol	7
6. Farmacología de Resveratrol.....	8
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
1. Hipótesis	10
2. Objetivo General.....	10
3. Objetivos Específicos (OEs)	10
METODOLOGÍA	12
1. Cultivos celulares y transfección:	12
2. Plásmidos:	12
3. Selección y preparación de estructuras para ensayos <i>in silico</i> :.....	12
4. Docking Molecular:	13
5. Registros electrofisiológicos:	13
6. Análisis estadísticos:.....	15

RESULTADOS	16
1. Evaluación mediante estudios <i>in silico</i> de los sitios moleculares putativos de unión de resveratrol en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGli.	16
1.1 Exploración de los potenciales sitios de unión de Resveratrol en RGli $\alpha 1$ mediante docking no restringido.....	16
1.2 Exploración de los potenciales sitios de unión de Resveratrol en RGli $\alpha 2$ mediante AutoDock Vina.....	21
1.3 Exploración de los potenciales sitios de unión de Resveratrol en RGli $\alpha 3$ mediante AutoDock Vina	24
1.4 Caracterización estructural y energética de los complejos de unión de resveratrol en el receptor de glicina mediante Maestro.	27
2. Determinación de los efectos moduladores de resveratrol sobre la función de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGli mediante registros electrofisiológicos.	34
2.1 Sensibilidad del receptor RGli alfa 1 a resveratrol.....	34
2.2 Sensibilidad del receptor RGli alfa 2 a resveratrol.....	38
2.3 Sensibilidad del receptor RGli alfa 3 a resveratrol.....	44
2.4 Evaluación del cambio de la afinidad aparente RGli $\alpha 1$ por resveratrol.	46
2.5 Evaluación del cambio de la afinidad aparente RGli $\alpha 2$ por resveratrol.	48
2.6 Evaluación del cambio de la afinidad aparente RGli $\alpha 3$ por resveratrol.	49
2.7 Evaluación de la actividad agonista de Resveratrol en el Receptor de Glicina.....	51

3.	Investigar la relevancia de los residuos putativos de unión determinados por los análisis <i>in silico</i> en los efectos de resveratrol en la subunidad α 1 del RGli.....	53
	DISCUSIÓN.....	56
1.	Determinar mediante estudios <i>in silico</i> los sitios moleculares putativos de unión de resveratrol en las subunidades α 1, α 2 y α 3 del RGli.....	56
2.	Determinar los efectos moduladores de resveratrol sobre la función de las subunidades α 1, α 2 y α 3 del RGli mediante registros electrofisiológicos.....	58
3.	Investigar la relevancia de los residuos putativos de unión determinados por los análisis <i>in silico</i> en los efectos de resveratrol en la subunidad α 1 del RGli.....	60
	CONCLUSIONES	63
4.	9. BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Resveratrol modula alostéricamente al receptor de glicina.....	xvii
Figura 2: Representación esquemática del receptor de glicina.	4
Figura 3: Estructura química de Resveratrol.....	9
Figura 4: Modelamiento de RGLi $\alpha 1$, $\alpha 2$ y Estructura de RGLi $\alpha 3$ y estructura de Resveratrol.....	18
Figura 5: Docking sin restricción RGLi $\alpha 1$ conformación abierta unida a RS mediante Autodock Vina.....	19
Figura 6: Docking sin restricción RGLi $\alpha 1$ conformación cerrada unida a RSV mediante Autodock Vina.....	20
Figura 7: Docking sin restricción RGLi $\alpha 2$ conformación abierta unida a RSV mediante Autodock Vina.....	22
Figura 8: Docking sin restricción RGLi $\alpha 2$ conformación cerrada unida a RSV mediante Autodock Vina.....	23
Figura 9: Docking sin restricción RGLi $\alpha 3$ conformación abierta unida a RSV mediante Autodock Vina.....	25
Figura 10: Docking sin restricción RGLi $\alpha 3$ conformación cerrada unida a RSV mediante Autodock Vina.....	26
Figura 11: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGLi $\alpha 1$	29
Figura 12: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGLi $\alpha 2$	30
Figura 13: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGLi $\alpha 2$	31
Figura 14: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGLi $\alpha 3$	32

Figura 15: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGl α 3.....	33
Figura 16: Curva concentración respuesta RGl α 1 en células HEK293.....	35
Figura 17: Curva concentración respuesta RGl α 1 β en células HEK293.....	36
Figura 18: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGl α 1 expresados en células HEK293.	37
Figura 19: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGl α 1 β expresados en células HEK293	38
Figura 20: Curva concentración respuesta RGl α 2 en células HEK293.....	40
Figura 21: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGl α 2 β expresados en células HEK293	41
Figura 22: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGl α 2 expresados en células HEK293.	42
Figura 23: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGl α 2 β expresados en células HEK293.....	43
Figura 24: Curva concentración respuesta RGl α 3 en células HEK293.....	44
Figura 25: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGl α 3 expresados en células HEK293.	45
Figura 26: Mecanismo de inhibición de la molécula de resveratrol en el receptor de glicina α 1.....	47
Figura 27: Mecanismo de inhibición de la molécula de resveratrol en el receptor de glicina α 2.....	48
Figura 28: Mecanismo de inhibición de la molécula de resveratrol en el receptor de glicina α 3.....	50
Figura 29: Efecto agonista de resveratrol en RGl α recombinante.....	52

Figura 30: Descripción estructural de la interacción proteína-ligando con sitio de unión mutado (conformación cerrada)..... 68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades energéticas del docking dirigido RGli $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ con los sitios representados mediante Maestro.	28
Tabla 2	Resumen valores EC_{50} de RGli.....	46
Tabla 3	Resumen valores IC_{50} de la modulación de RGli por resveratrol	46
Tabla 4	Actividad de RSV sobre diferentes conformaciones de RGli.....	50
Tabla 5	Propiedades energéticas de mutación <i>in silico</i> RGli $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$	54

Abreviaturas

1. RGLi: Receptor de Glicina.
2. RGLi α 1: Receptor de Glicina alfa 1.
3. RGLi α 2: Receptor de Glicina alfa 2.
4. RGLi α 3: Receptor de Glicina alfa 3.
5. RGLi α 1 β : Receptor de Glicina alfa 1 beta.
6. RGLi α 2 β : Receptor de Glicina alfa 2 beta.
7. RGLi α 3 β : Receptor de Glicina alfa 3 beta.
8. RSV: Resveratrol.
9. pLGIC: Canales iónicos pentaméricos activados por ligando.
10. RGABA: Receptor Ácido γ -aminobutírico.
11. RnACh: Receptor nicotínico de acetilcolina.
12. 5-HT3: Receptor 5-hidroxitriptamina o de serotonina.
13. mRGLi: Receptor de Glicina metabotrópico.
14. Célula HEK293: Células embrionarias de riñón humano 293.
15. ECD: Dominio extracelular.
16. TMD: Dominio transmembrana.
17. ICD: Dominio intracelular.
18. TTX: Tetrodotoxina.
19. PTX: Picrotóxina.
20. IGLi: Corrientes glicinérgicas.
21. DMSO: Di-metilsulfóxido.
22. BHE: Barrera hematoencefálica.
23. GFP: Proteína verde fluorescente.
24. WT: Tipo Silvestre (Wild Type).
25. EC₅₀: Concentración que evoca el 50% de la respuesta máxima.
26. IC₅₀: Concentración de una molécula que inhibe el 50% de la respuesta máxima.
27. *In silico*: Refiere a procedimientos hechos en un computador.

28. Docking score: Parámetro de evaluación de la capacidad de interacción de una molécula generado por los programas de docking proteína-ligando.
29. pA: Picoamperio. Unidad de corriente eléctrica equivalente a 10^{-12} amperios.
30. μM : Micromolar, unidad de concentración equivalente a 10^{-6} .
31. mM: Milimolar, unidad de concentración equivalente a 10^{-3} .
32. mg: Miligramo, unidad de masa equivalente a 10^{-3} .
33. g: Gramo, unidad de masa.
34. μl : Microlitro, unidad de volumen equivalente a 10^{-6} .
35. μg : Microgramo, unidad de masa equivalente a 10^{-6} .
36. PDB: Protein Data Bank, base de datos de estructuras de proteínas.
37. mV: Milivoltios, unidad de medida de la tensión eléctrica equivalente a la milésima parte de un voltio.
38. kHz: Kilohercio, unidad de frecuencia equivalente a mil ciclos por segundos.
39. n_{Hill} : Número de Hill.
40. kg: Kilogramo, unidad de masa equivalente a 10^3 .
41. $\Delta G_{\text{unión}}$: Parámetro termodinámico teórico obtenido desde estudios docking molecular que indica la energía libre de Gibbs de una interacción ligando-receptor.

Resumen

El receptor de glicina (RGli) pertenece a la familia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGIC). El complejo funcional corresponde al ensamblaje de 5 subunidades formando un poro central, permeable a iones cloruro y mediando las neurotransmisiones inhibitorias rápidas en el SNC. A la fecha se han identificado cuatro subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) y una subunidad β del RGli.

La estructura del RGli presenta un dominio extracelular (ECD), 4 dominios transmembrana (TMD) y un dominio intracelular (ICD). Además, su estructura presenta sitios para la modulación alostérica tanto para sustancias exógenas como endógenas entre las cuales encontramos alcoholes, anestésicos generales, neuroesteroides y cannabinoides. Durante los últimos años nuevas moléculas de origen natural o sintético, como la gelsemina y el resveratrol han demostrado tener efectos moduladores sobre la función del RGli.

El resveratrol es un fitopolifenol aislado de semillas y piel de uva, que presenta una amplia actividad biológica y un gran potencial clínico. Estudios recientes han evidenciado que el resveratrol inhibe la transmisión sináptica de neuronas del colículo inferior y de la corteza auditiva de ratas mediadas por RGli, pero no así la transmisión sináptica mediada por RGABA_A. De igual manera se ha descrito que el resveratrol inhibe las corrientes glicinérgicas (IGli) en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan el RGli, sugiriendo que la acción antagónica producida por resveratrol inhibe la función del RGli por medio de un mecanismo alostérico que aún no ha sido descrito. Por este motivo, en este trabajo estudiamos a través de simulaciones de docking proteína-ligando, registros electrofisiológicos y mutaciones sitio dirigida *in silico* los posibles sitios de acción de resveratrol en el RGli, además de evaluar la especificidad de esta modulación en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 1\beta$ y $\alpha 2\beta$ del RGli.

En la presente investigación se logró predecir que la molécula presenta un sitio de unión conservado en las tres subunidades alfa del receptor de glicina, y que, este se localiza en un sitio cercano al ortostérico de glicina. Por medio de electrofisiología se observó que resveratrol inhibe las corrientes glicinérgicas en las conformaciones homomérica y heteropentamérica sugiriendo que Resveratrol es un modulador inhibitorio no competitivo del receptor de glicina.

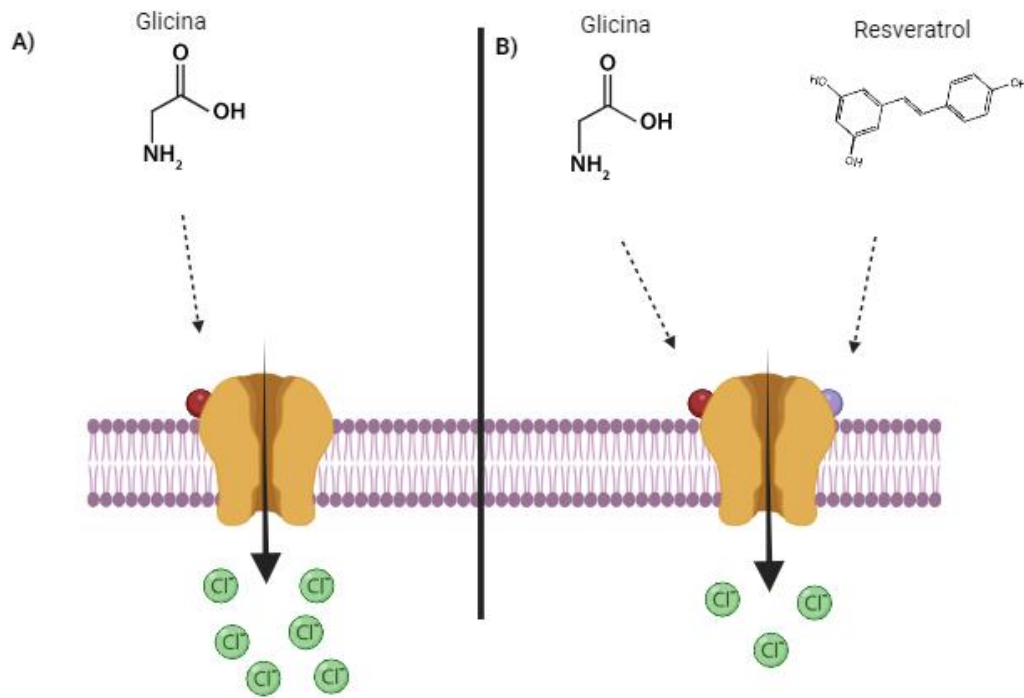


Figura 1: Resveratrol modula alostericamente al receptor de glicina. A) Glicina (esfera café) se une en el sitio ortostérico de RGli, desencadenando la apertura del canal y posterior flujo de iones cloruro (esferas verdes). B) La unión de resveratrol (esfera lila) en el receptor de glicina presenta un efecto modulador negativo, inhibiendo las corrientes glicinérgicas (I_{glic}). Creado con BioRender.com

Abstract

The glycine receptor (RGli) belongs to the family of pentameric ligand-gated ion channels (pLGIC). The functional complex corresponds to the assembly of 5 subunits forming a central pore, permeable to chloride ions and mediating fast inhibitory neurotransmissions in the CNS. To date, four subunits α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) and one β -subunit of RGli have been identified.

The structure of RGli has an extracellular domain (ECD), a transmembrane domain (TMD) consisting of 4 alpha helices and an intracellular domain (ICD). In addition, its structure presents sites for allosteric modulation for both exogenous and endogenous substances including alcohols, general anesthetics, neurosteroids and cannabinoids. During the last few years new molecules of natural or synthetic origin, such as gelsemine and resveratrol have been shown to have modulatory effects on RGli function.

Resveratrol is a phytopolyphenol isolated from grape seeds and skin, which has a broad biological activity and a great clinical potential. Recent studies have shown that resveratrol inhibits RGli-mediated synaptic transmission of neurons in the inferior colliculus and auditory cortex of rats, but not RGABAA-mediated synaptic transmission. Similarly, it has been described that resveratrol inhibits glycinergic currents (IGli) in *Xenopus laevis* oocytes expressing RGli, suggesting that the antagonistic action produced by resveratrol inhibits RGli function by means of an allosteric mechanism that has not yet been described. For this reason, in this work we studied through protein-ligand docking simulations, electrophysiological recordings and in silico site-directed mutations the possible sites of action of resveratrol on RGli, in addition to evaluating the specificity of this modulation on the subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 1\beta$ and $\alpha 2\beta$ of RGli.

In the present investigation we were able to predict that the molecule presents a conserved binding site in the three alpha subunits of the glycine receptor, and that it is located in a site close to the glycine orthosteric site. By means of

electrophysiology it was observed that resveratrol inhibits glycinergic currents in the homomeric and heteropentameric conformations suggesting that Resveratrol is a non-competitive inhibitory modulator of the glycine receptor.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del receptor de glicina

El receptor de glicina (RGli) pertenece a la familia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGICs, por sus siglas en inglés) junto a los receptores nicotínico de acetilcolina (nAChR), de serotonina tipo 3 (5-HT3) y de GABA tipo A y C (GABA_AR, GABA_CR) (1-3).

La estructura funcional de RGli corresponde al ensamblaje de 5 subunidades, formando un poro central, permeable a iones cloruro (1). El receptor de glicina media la neurotransmisión inhibitoria rápida en la médula espinal, el tronco encefálico y el cerebro caudal donde juega un papel fundamental en el control de funciones motoras y sensoriales, incluidas la visión y audición (2). Tras la activación por su agonista glicina, el RGli permite el paso de iones cloruro a favor de su gradiente electroquímico, hiperpolarizando la membrana postsináptica, controlando de esta forma la excitabilidad de la red neuronal (4).

A la fecha cuatro subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) y una subunidad β del RGli han sido clonadas y extensamente caracterizadas funcional y farmacológicamente (1). El complejo pentamérico puede presentar dos configuraciones, homoméricas formadas solo por subunidades α o heteroméricas formadas por subunidades α y β con una estequiometría $2\alpha:3\beta$ (5), sin embargo, un estudio reciente describió para el RGli $2\alpha\beta$ una estequiometría de $4\alpha:1\beta$ (6). A nivel funcional, se ha determinado que solo la subunidad α es la responsable de formar el canal funcional y de poseer sitios de unión tanto para agonistas como antagonistas, mientras que la subunidad β solo forma canales funcionales en presencia de la subunidad α (7-9). Sin embargo, la expresión de la subunidad β le otorga propiedades farmacológicas distintas al receptor como la disminución de la sensibilidad al bloqueador picrotoxina (10), además de regular su localización y/o la formación de agrupaciones o “clúster” a través de una interacción directa con

la proteína intracelular gefirina que ancla el receptor al citoesqueleto (10-12). Por otro lado, numerosas líneas de investigación sugieren que gran parte de la neurotransmisión glicinérgica en adultos está mediada por el receptor heteromérico $\alpha 1\beta$, (10, 13). Asimismo, se ha evidenciado que $\alpha 3\beta$ RGLi es un importante mediador de la neurotransmisión inhibitoria glicinérgica en circuitos neuronales sensoriales nociceptivos en láminas del asta dorsal de la medula espinal (10).

En el caso de las subunidades α , aun cuando estas comparten una estrecha similitud de secuencias, difieren significativamente en su patrón de expresión en el sistema nervioso central (SNC), parámetros cinéticos y farmacología (1, 2). En este contexto, mientras la subunidad $\alpha 1$ se encuentra predominantemente expresada en la médula espinal y el tronco encefálico (14) la subunidad $\alpha 2$ se expresa abundantemente en neuronas embrionarias, aunque sus niveles de expresión disminuyen en la edad adulta (10), limitándose a regiones del núcleo accumbens y núcleo estriado (15). En tanto la subunidad $\alpha 3$ se encuentra restringida a las láminas I y II del asta dorsal de la medula espinal, el núcleo accumbens y la retina (2). Por otra parte, estudios han identificado que el mal funcionamiento del RGLi ha sido asociado a la generación de estados patológicos como hiperekplexia, epilepsia y dolor crónico (1, 16, 17).

2. Topología y estructura general del receptor de glicina

Estudios tempranos sobre la secuencia primaria y predicciones de topología de membrana del RGLi (9, 18, 19) han mostrado que cada subunidad es un polipéptido de aproximadamente 500 aminoácidos, el cual presenta un dominio extracelular (ECD, por sus siglas en ingles) y está formado principalmente por estructuras tipo hojas beta plegadas, un dominio transmembrana (TMD) el cual consta de 4 alfa hélices transmembranas (TM 1-4) y un dominio intracelular (ICD), conectando el TM3 y TM4 (4, 10, 20). Cada una de las cinco subunidades

aporta una hélice anfipática TM2 al revestimiento del poro central (10). Estudios estructurales han mostrado además que el ECD contiene el sitio de unión a ligando (sitio ortostérico), el cual presenta principalmente láminas hojas beta conectadas por bucles flexibles, (10). De igual modo las cadenas laterales de los residuos que componen el TM2 delimitan el poro central. A pesar de que los datos estructurales del ICD no están completos, se sabe que es una región con una alta movilidad intrínseca, la cual presenta estructuras de alfa hélices en las regiones aledañas a la membrana (21). La importancia del ICD radica en su rol en el tráfico de receptores, agrupación sináptica, un sitio central para modificaciones postraduccionales y regulación por medio de moduladores endógenos y exógenos (21).

Estudios estructurales en presencia/ausencia de agonistas/antagonistas y estudios funcionales electrofisiológicos han mostrado que una vez unido el agonista al sitio ortostérico, el ECD sufre un rearrreglo conformacional (rotación en sentido anti-horario) movimiento que es transducido hacia la región transmembrana expandiendo el diámetro del canal, permitiendo así el flujo de iones cloruro a favor de su gradiente electroquímico (21). Es importante mencionar que tres moléculas de glicina son suficientes para activar al máximo un RGLi homoméricos (10, 13, 22).

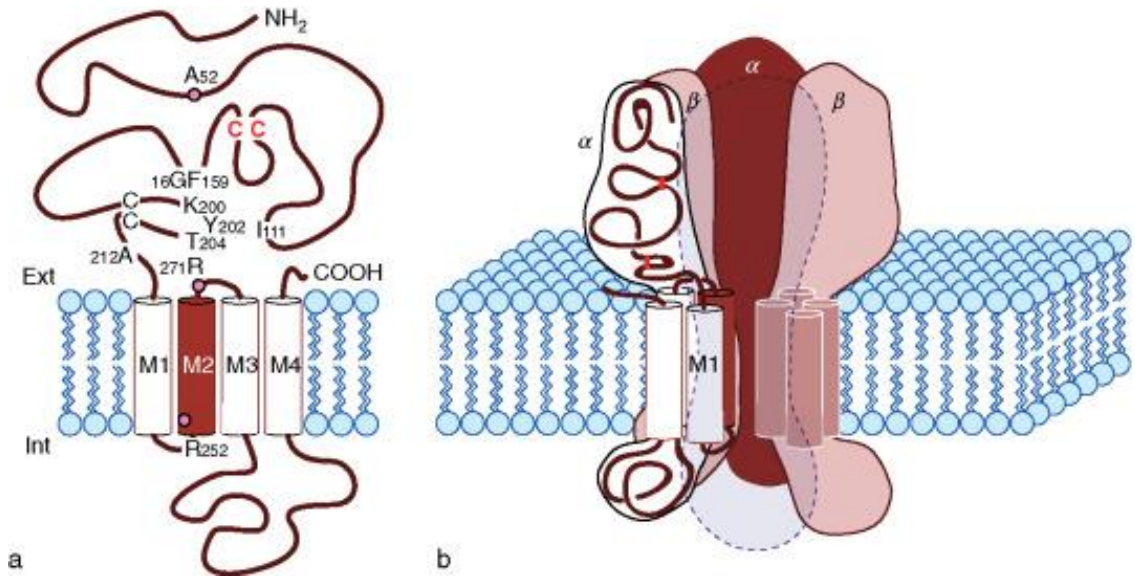


Figura 2: Representación esquemática del receptor de glicina. A) Topología de la subunidad alfa, donde se muestra la posición del enlace disulfuro característico en color rojo. Se destacan los aminoácidos importantes para la unión de agonistas o la modulación de la función del canal. Se observa el dominio extracelular (ECD), dominio transmembrana (TMD) del TM1-TM4 y dominio intracelular (ICD). B) Disposición de las subunidades alfa y beta para formar un canal heteromérico. (20)

3. Modulación alostérica del receptor de glicina

El receptor de glicina presenta sitios para la modulación alostérica de diversas moléculas, tanto exógenas como endógenas, entre las cuales encontramos alcoholes, anestésicos generales, neuroesteroides y cannabinoides (4, 16, 23). Por ejemplo, el etanol es capaz de potenciar las corrientes del receptor de glicina en sistemas heterólogos de expresión (Células HEK293, Ovocitos de *Xenopus laevis*) y en neuronas (espinales e hipocampales) (24, 25). La función de RGli es, además, fuertemente potenciada por agentes que causan anestesia general como: alcoholes de cadena larga, halotano, isoflurano, enflurano, sevoflurano, tricloroetanol, propofol, alphaxolona, pentobarbital y etomidato (26-31). El RGli,

posee un rol clave en la coordinación de la respuesta a estímulos dolorosos a nivel de la médula espinal, lo que ha permitido sugerir un papel en la generación de analgesia y anestesia (32, 33). En el caso de anestésicos no volátiles como propofol, pentobarbital o n-alcoholes, potencian la función del receptor de glicina nativo y recombinantes. Por ejemplo, pentobarbital aumenta el tiempo de decaimiento de los eventos glicinérgicos en neuronas de la raíz dorsal (34) mientras que propofol incrementa la duración de los eventos inhibitorios postsinápticos e incrementa la respuesta máxima a glicina en neuronas espinales (25, 35), en receptores recombinantes expresados en ovocitos de *X. laevis* (36) y en células HEK293 (24). A la fecha, los mecanismos moleculares que median los efectos de estos moduladores alostéricos aún son materia de debate. A través de estudios electrofisiológicos, bioquímicos y estructurales se ha postulado que sitios discretos, localizados en la región transmembrana del RGli, son los blancos moleculares de los compuestos anteriormente mencionados (37, 38). Asimismo, la actividad del RGli puede ser modulada por proteínas intracelulares (16, 23), tal como las subunidades G $\beta\gamma$ de la proteína G y mediante procesos de fosforilación a través de las proteínas quinasas (39, 40). De igual manera, durante la última década, se ha evidenciado que el ICD, juega un papel importante en los efectos de estas drogas (41).

En este contexto, durante los últimos años, nuevas moléculas de origen natural o sintética han demostrado efectos moduladores sobre la función del RGli. Por ejemplo, la sulfonamida tricíclica AM-1488 ha mostrado ser un potente modulador del RGli $\alpha 3$ (42, 43) mientras que el tropisetron actúa como un inhibidor de la función del RGli $\alpha 3$ (44). Además, compuestos naturales como la gelsemina (45) o el resveratrol (46) muestran una actividad inhibitoria sobre la función del RGli. En el caso de resveratrol, es muy interesante que una reciente investigación haya mostrado que es capaz de modular las corrientes glicinérgicas en el colículo inferior y en la corteza auditiva. (46)

4. Generalidades del Resveratrol

El resveratrol es un fitopolifenol aislado de semillas y piel de uva, arándano, maní, moras, vino tinto. Presenta una amplia actividad biológica y un gran potencial clínico, debido a que en la actualidad es comercializado como una molécula que presenta propiedades beneficiosas para la salud como anticancerígeno, antioxidantes, antiplaquetarias y antibacterianos (46-48).

Estudios recientes han sugerido que resveratrol es capaz de modular la actividad de varios tipos de receptores de membrana y canales iónicos. Por ejemplo, esta molécula inhibe las corrientes de Na⁺ sensibles a TTX en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (49), las corrientes inducidas por glutamato son suprimidas significativamente en neuronas piramidales postsinápticas de rata (50, 51). Asimismo, resveratrol inhibe reversiblemente las corrientes inducidas por acetilcolina en el receptor nicotínico de acetilcolina expresado en ovocitos de *X. laevis* de una manera dependiente de concentración (52), potencia al receptor serotoninérgico expresados en ovocitos de *X. laevis* de manera reversible y dependiente de concentración (53), y modula positivamente la corriente inducida en los RGABA_A expresado en ovocitos de *X. laevis* (54, 55). Por el contrario, resveratrol es capaz de reducir las corrientes inducidas por GABA en los receptores de tipo C expresados en ovocitos de *X. laevis* (56).

De manera interesante, investigaciones han mencionado que resveratrol podría prevenir enfermedades neurodegenerativas (57, 58) y podría ser eficiente contra la lesión por isquemia cerebral (59).

5. Modulación del receptor de glicina por resveratrol

Los canales iónicos pentaméricos activados por ligando parecen ser blancos farmacológicos atractivos para el resveratrol que afecta el funcionamiento de algunos miembros de la familia. En esta línea, se ha descrito que el resveratrol inhibe las corrientes glicinérgicas (IGli) en ovocitos de *X. laevis* que expresan RGli α 1 (48) y de las neuronas del colículo inferior y la corteza auditiva de rata (46), pero no afecta la transmisión sináptica mediada por RGABA_A (46). La molécula de resveratrol reduce reversiblemente la amplitud de IGli cuando se aplica previa a la aplicación de glicina, lo que sugiere que la molécula puede unirse al canal antes de la acción de glicina (46) y de una manera dependiente de concentración cuando resveratrol es co-aplicado con glicina. Finalmente, este fitopolifenol produce un desplazamiento hacia la derecha con una reducción de las respuestas máximas de la curva de concentración-respuesta para glicina en RGli α 1 expresado en ovocitos de *X. laevis* (48).

En una investigación realizada en el año 2014, sugieren que posiblemente resveratrol funciona como un nuevo agente que inhibe la unión de glicina en su sitio de unión a RGli o como un posible bloqueador del canal abierto del receptor. En esta misma línea, otros resultados señalan que resveratrol no cambia significativamente el coeficiente de Hill, indicando que resveratrol modula a la subunidad α 1 receptor de glicina de una manera no competitiva (48).

En conclusión, estos resultados sugieren que el resveratrol inhibe la función de la subunidad α 1 de RGli y a los RGli nativos presentes en el colículo inferior y la corteza auditiva de ratas por medio de un mecanismo alostérico no competitivo. Sin embargo, aún no existe evidencia de la modulación de resveratrol en otras configuraciones de RGli α 2, α 3, α 1 β , α 2 β y α 3 β y no se ha explorado su sitio de unión en el receptor de glicina.

6. Farmacología de Resveratrol

La estructura química de resveratrol consiste en 2 anillos fenólicos que se encuentran unidos por un doble enlace estireno que forman 3,5,4'-trihidroxiestilbeno (Figura 3) (peso molecular: 228,25 g/mol) (60), se encuentra naturalmente en sus isoformas Trans y Cis (Figura 3A, 3B). Sin embargo, la mayoría de los beneficios publicados se atribuyen a la isoforma trans-Resveratrol (61), ya que es la forma más estable desde el punto de vista estérico (60).

Resveratrol presenta una baja solubilidad en agua (< 0,05 mg/ml), sin embargo, para mejorar la solubilidad se puede utilizar etanol o solventes orgánicos como DMSO (60). El resveratrol se absorbe por difusión pasiva o por medio de transportadores a través de la membrana apical del enterocito y luego se metaboliza (62). Una porción del resveratrol ingerido (90%) llega al colon en su forma intacta, posteriormente se somete a fermentación intestinal, para ser absorbido y llegar a la vena porta que transporta los metabolitos producidos hacia el hígado. Luego, los metabolitos ingresan a la circulación sistémica y llegan a los tejidos y células objetivo, donde se puede demostrar su importancia fisiológica (63). En este contexto, se ha demostrado en varios estudios en animales que la molécula de resveratrol es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE), lo que da lugar a concentraciones detectables pero bajas de la molécula de RSV (64-66). Esto se evidenció tras una administración crónica de RSV a roedores (inyecciones intraperitoneales de 8-30mg/kg) y mostrando que RSV protegió significativamente el hipocampo de los roedores expuestos a ácido kaínico (67) o la oclusión de las arterias carótidas (64, 68). Dos de los primeros estudios en humanos (62, 69), de absorción y biodisponibilidad de resveratrol, emplearon dosis únicas (25mg) observando que tras el consumo la absorción fue de 70% alcanzando una concentración plasmática de resveratrol en conjunto con sus metabolitos de 400-500ng/ml (~2mM), indicando que presenta una alta absorción, pero una baja biodisponibilidad (60, 62, 69). Otros ensayos clínicos han demostrado que RSV es bien tolerado y farmacológicamente seguro a 5 g/día

(61, 70) y que el consumo de 8 mg/día ha reducido significativamente el número de factores de riesgos cardiacos (71).

La molécula de resveratrol ha ganado gran interés dentro comunidad científica por ser un fitopolifenol con potenciales usos terapéuticos. Sin embargo, se necesita más investigaciones para determinar la dosis adecuada y el mecanismo de acción de esta molécula en cada uno de los canales que modula.

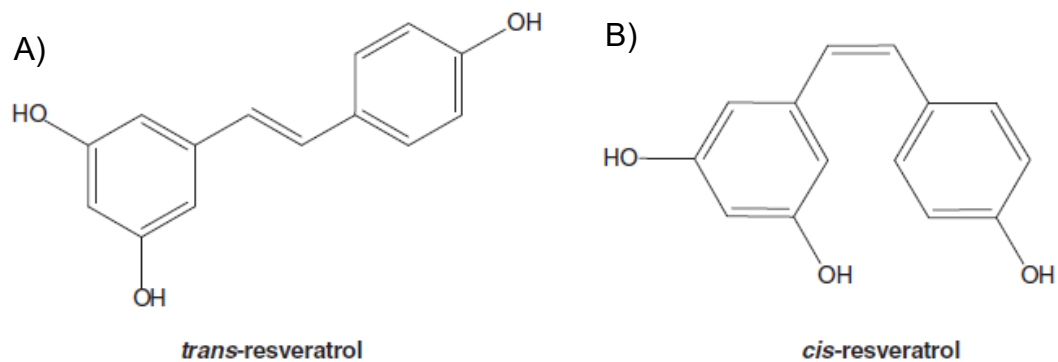


Figura 3: Estructura química de Resveratrol. A) isoforma trans-resveratrol, molécula más estable, puede ser potencialmente encontrada en uvas negra o vino tinto. B) isoforma cis-resveratrol, se encuentra en menor proporción en la naturaleza (60).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Basado en los antecedentes discutidos anteriormente, se ha establecido que Resveratrol presenta efectos moduladores en la familia de receptores pentaméricos activados por ligando (pLGLIC) (46, 48-50, 53, 55, 56). Observando con gran atención la modulación que ejerce la molécula de RSV en el receptor de glicina, destacando que solo existen investigaciones en la subunidad $\alpha 1$ expresados en ovocitos de *Xenopus leavis* (48) y en corteza auditiva y colículo inferior de rata (46). Por este motivo, el presente estudio propone la siguiente hipótesis.

1. Hipótesis

Resveratrol es capaz de modular la función de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGLi a través de sitios discretos localizados en la región del poro del receptor.

2. Objetivo General

Determinar los blancos moleculares y la especificidad para resveratrol en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGLi.

3. Objetivos Específicos (OEs)

OE 1. Evaluar mediante estudios *in silico* los sitios moleculares putativos de unión de resveratrol en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGLi.

OE 2. Determinar los efectos moduladores de resveratrol sobre la función de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGlI mediante registros electrofisiológicos.

OE 3. Investigar la relevancia de los residuos putativos de unión determinados por los análisis *in silico* en los efectos de resveratrol en la subunidad $\alpha 1$ del RGlI.

METODOLOGÍA

1. Cultivos celulares y transfección:

Se utilizaron células HEK293 (Human Embryonic Kidney), las que fueron cultivadas y transfectadas según protocolos previamente descritos (45). La transfección se realizó con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El reactivo se agregó en una proporción de 0,7 μ l por cada 1 μ g de DNA para los RGli a transfectar en 50 μ l de Opti-MEM® I (1x) (Invitrogen). Esta mezcla fue agregada directamente sobre las células, las cuales se estudiaron después de 18 a 24 horas post-transfección.

2. Plásmidos:

Los plásmidos utilizados en este proyecto son los siguientes (gen/vector): GFP/pGreenLatern, RGli- α 1/pcDNA3, RGli- α 2/pcDNA3, RGli- α 3/pcDNA3, RGli- α 1 β /pcDNA3 y RGli- α 2 β /pcDNA3 todos disponibles en nuestro laboratorio.

3. Selección y preparación de estructuras para ensayos *in silico*:

Para las predicciones realizadas se utilizaron estructuras resueltas experimentalmente en sus estados abiertos y cerrados de α 1RGli (PDB: 6PM6 (72), 3JAD (73)), α 2RGli (PDB: 5BKG (6), 7KUY(6)) y α 3RGli (PDB: 5TIO (43), 5CFB (74)), obtenidos desde la base de datos de Protein DataBank (PDB). Previo a su utilización, se generaron modelos humanos para RGli α 1 y α 2 con el software Modeller y se visualizaron en el programa PyMOL. Luego las estructuras y modelos fueron preparadas utilizando el software Maestro (Schrödinger, LLC,

New York, NY, 2020), incluyendo la adición de átomos de hidrogeno en las estructuras, corrección y adición de cadenas laterales y la generación de sus estados de ionización a pH 7 ± 0.2 .

Por su parte, la estructura de Resveratrol (CID: 445154 (75)) y Glicina (CID: 750) se obtuvieron desde la base de datos PubChem y fueron preparadas utilizando LigPrep (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020).

4. Docking Molecular:

Inicialmente, se realizó una predicción de la unión molecular entre Resveratrol (RSV) y RGLi α 1, α 2 y α 3 mediante el software Autodock Vina. La grilla de interacción fue ajustada para contener la estructura completa del receptor con el fin de realizar una estrategia de docking sin restricciones. Posteriormente, se generó una grilla específica para los aminoácidos que conforman el sitio de unión para RSV predicho, generando un docking sitio-dirigido mediante el software Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) (76, 77). El cálculo teórico de ΔG de unión fue realizado mediante la aproximación MM-GBSA usando Prime (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020). Los complejos RGLi α 1, α 2 y α 3 fueron caracterizados con la herramienta *Ligand Interaction Diagram* (LID), mediante una representación esquemática de los aminoácidos que forman parte del bolsillo de unión, identificando enlaces de hidrógeno e interacciones apolares y polares. Las imágenes se confeccionaron mediante Maestro (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) y PyMOL.

5. Registros electrofisiológicos:

Soluciones: Solución externa: 150mM NaCl, KCl 5.4mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM, HEPES 10mM. La solución se ajustó a pH 7,4 y a una

osmolaridad entre 320-330 mOsm, almacenándose a 4°C hasta el momento de utilización. Solución interna: CsCl 120mM, MgCl₂ 2mM, ATP-Na₂ 2mM, BAPTA 10 mM, GTP 0.5 mM y HEPES 10 mM. Esta solución se ajustó a pH 7,35 – 7,4 y 290-310 mOsm almacenándose a -20 °C. La solución “stock” de glicina 10mM se preparó utilizando Glicina hidrocioruro (Sigma). Por su parte, la solución “stock” de Resveratrol 10mM se preparó utilizando resveratrol (SigmaAldrich, USA). Las pipetas de registro se fabricaron con capilares de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) con el uso de un puller vertical (Sutter Instruments P- 89, Novato, CA) y una microforja (MF-830, Narishige Japan) para obtener pipetas de resistencia 5-6 MΩ para el modo célula completa.

Registros Electrofisiológicos: Los registros electrofisiológicos se realizaron en modo célula completa (“*Whole-cel*”), utilizando un microscopio invertido (Diaphot, Nikon, Japan) acoplado a una unidad de fluorescencia. Las células positivamente transfectadas fueron detectadas mediante la emisión de fluorescencia por la expresión de GFP utilizando filtros para FITC en el microscopio.

El potencial de membrana fue fijado a -60 mV y la corriente se filtró a 2kHz. Se aplicó el agonista Glicina mediante una línea de perfusión doble, la cual se ubicó aproximadamente a 50µm de la célula. La concentración de glicina (1-1000µM) (44) se aplicó durante 3-6 segundos para realizar los registros de corriente evocada según la subunidad de estudio. Las corrientes evocadas por glicina fueron registradas con un amplificador EPC10 (HEKA Electronics, Alemania) y los datos obtenidos se guardaron utilizando un computador conectado al sistema y el programa computacional Patchmaster (HEKA Electronics, Alemania).

Las curvas concentración-respuesta se construyeron a partir de las amplitudes de las corrientes evocadas por glicina utilizando la ecuación:

$$I_{gli} = I_{max} [gli]^{nh} / ([gli]^{nh} + [EC50]^{nh})$$

Además, los parámetros (EC_{50} y los coeficientes de Hill, nH) se obtuvieron de la ecuación descrita anteriormente.

Luego, se evaluó la inhibición de las corrientes de RGLi- $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en presencia de Resveratrol y Glicina mediante registros de célula completa aplicando concentraciones de 0,01-800 μ M de resveratrol durante 3-6 segundos co-aplicado con 100 μ M de glicina.

Posteriormente, se evaluó los parámetros del desplazamiento de la curva concentración-respuesta en RGLi- $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ aplicando glicina 1-1000 μ M co-aplicado con resveratrol 100 μ M.

Finalmente, se evaluó la actividad agonista de resveratrol en el receptor de glicina, utilizando dos concentraciones de la molécula resveratrol (800 y 1000 μ M).

6. Análisis estadísticos:

Las corrientes evocadas fueron cuantificadas con el software de análisis electrofisiológico ClampFit 10.7.0.3 (Axon Instruments). Para realizar los análisis estadísticos y gráficos resumen se utilizó el programa Origin 6.0 (Microcal, USA) donde los valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos mediante test t-Student. Además, en los gráficos, los valores expuestos se expresan como el promedio \pm error estándar.

RESULTADOS

1. Evaluación mediante estudios *in silico* de los sitios moleculares putativos de unión de resveratrol en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGLi.

El receptor de glicina presenta numerosos sitios de uniones alostéricas, las cuales ya se encuentran descritas (73), lo que nos ha permitido evaluar posibles interacciones de Resveratrol en las cavidades descritas del receptor.

Para iniciar con el análisis se realizó un docking proteína-ligando no restringido entre RGLi $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en sus conformaciones abierta y cerrada (**Figura 4**) con la molécula de Resveratrol para evaluar su capacidad de interacción y generar diferentes complejos de unión.

1.1 Exploración de los potenciales sitios de unión de Resveratrol en RGLi $\alpha 1$ mediante docking no restringido.

El análisis se realizó con la estructura de *Danio rerio* en conformación abierta y cerrada (PDB: 6PM6, 3JAD) humanizada por modelamiento por homología para obtener un homopentámero. La estructura modelada se obtuvo a partir del alineamiento de la cadena aminoacídica del templado de *D. rerio* frente a la cadena de aminoácidos del receptor de glicina humano. Como resultado se obtuvieron 100 modelos para la subunidad alfa 1 de las cuales se ranquearon los modelos según la función de puntuación interna del propio programa Modeller, permitiendo la selección del modelo que tenga la mejor calidad y por consiguiente menos errores.

La estructura se reconstituyó como homopentámero (la subunidad alfa 1 repetida 5 veces) utilizando como referencia la estructura molde del PDB 6PM6 y 3JAD, según corresponda.

Posteriormente, se realizó un docking sin restricción, es decir, se fabricó una grilla de igual tamaño que la subunidad en estudio con el fin de que resveratrol tuviese la libertad de situarse en todas las cavidades descritas del receptor. Esto mostró que en conformación abierta de RGl α 1, resveratrol presenta mayor afinidad por situarse entre en sitios intrasubunidad del dominio extracelular (ECD) del receptor interactuando con los aminoácidos como D⁷⁸, ⁸⁰DP⁸¹, ¹⁰⁷TDNKL¹¹¹, F²⁶, K⁸⁹, D⁹¹, ¹⁵³FGYT¹⁵⁶, D¹⁵⁹ (**Figura 5B**). Sin embargo, de manera interesante, cuando se evalúa RGl α 1 en conformación cerrada, resveratrol presenta mayor afinidad por situarse en el ECD muy cerca del bolsillo de unión al agonista del receptor de glicina ¹⁴⁹ESFG¹⁵², Y¹⁹⁴, F¹⁹⁹, ³⁴NIF³⁶, F⁵⁵, R⁵⁷, L¹⁰⁹, S¹²¹, Q¹⁶⁹ (**Figura 6B**) y por situarse en el poro de la proteína ²⁴⁹IT²⁵⁰, L²⁵³, T²⁵⁷, L²⁵³, T²⁵⁷, ²⁴⁹IT²⁵⁰, L²⁵³, T²⁵⁷, T²⁵⁰, L²⁵³, T²⁵⁷, L²⁵³, T²⁵⁷ (**Figura 6C**).

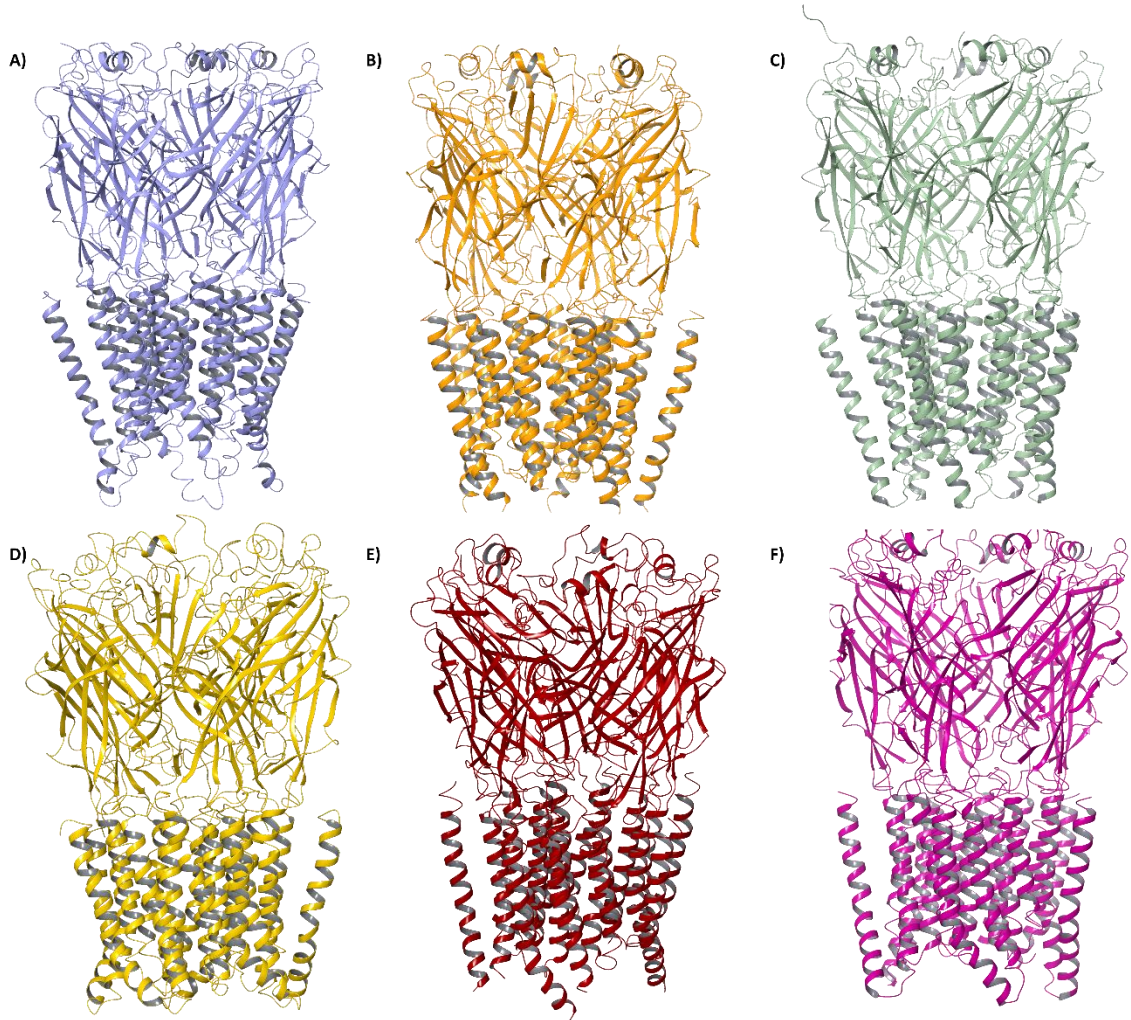


Figura 4: Modelamiento de RGLI α 1, α 2 y Estructura de RGLI α 3. (A) y (B) Modelo RGLI α 1 a partir de 6PM6 y Modelo RGLI α 2 a partir de 5BKF de *Danio rerio* en conformación abierta. (C) Estructura RGLI α 3 5TIO en conformación abierta. (D) y (E) Modelo RGLI α 1 a partir de 3JAD y modelo RGLI α 2 a partir de 7KUY modelada de *Danio rerio* en conformación cerrada. (F) Estructura RGLI α 3 5CFB en conformación cerrada.

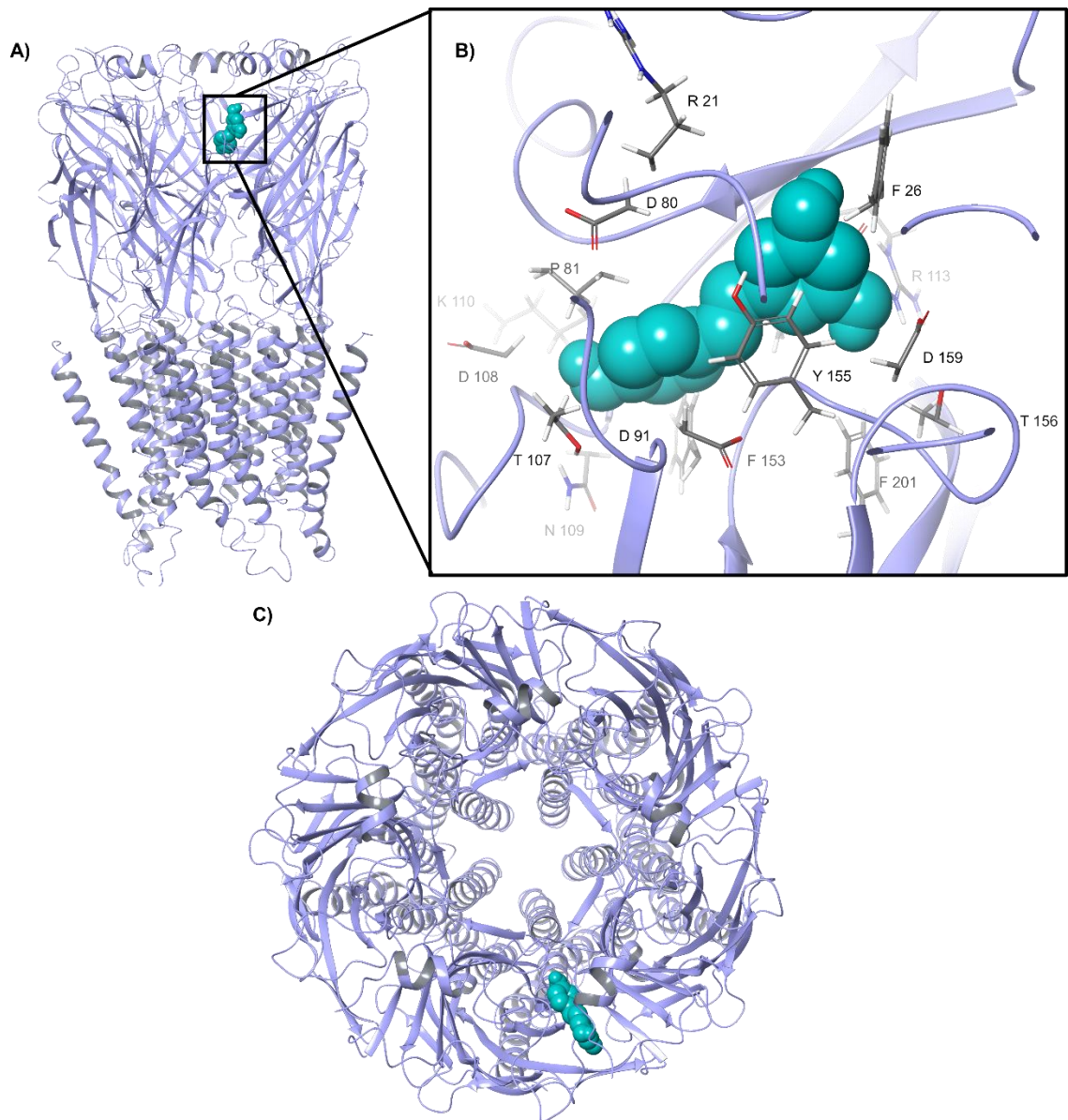


Figura 5: Docking sin restricción RGLI α 1 conformación abierta unida a RSV mediante Autodock Vina. A) Vista frontal del receptor de glicina alfa 1 en color lila y Resveratrol en color cian. B) Vista detallada del complejo de unión con los respectivos aminoácidos con sus cadenas laterales que interaccionan en el bolsillo de unión de resveratrol. C) Vista superior del receptor.

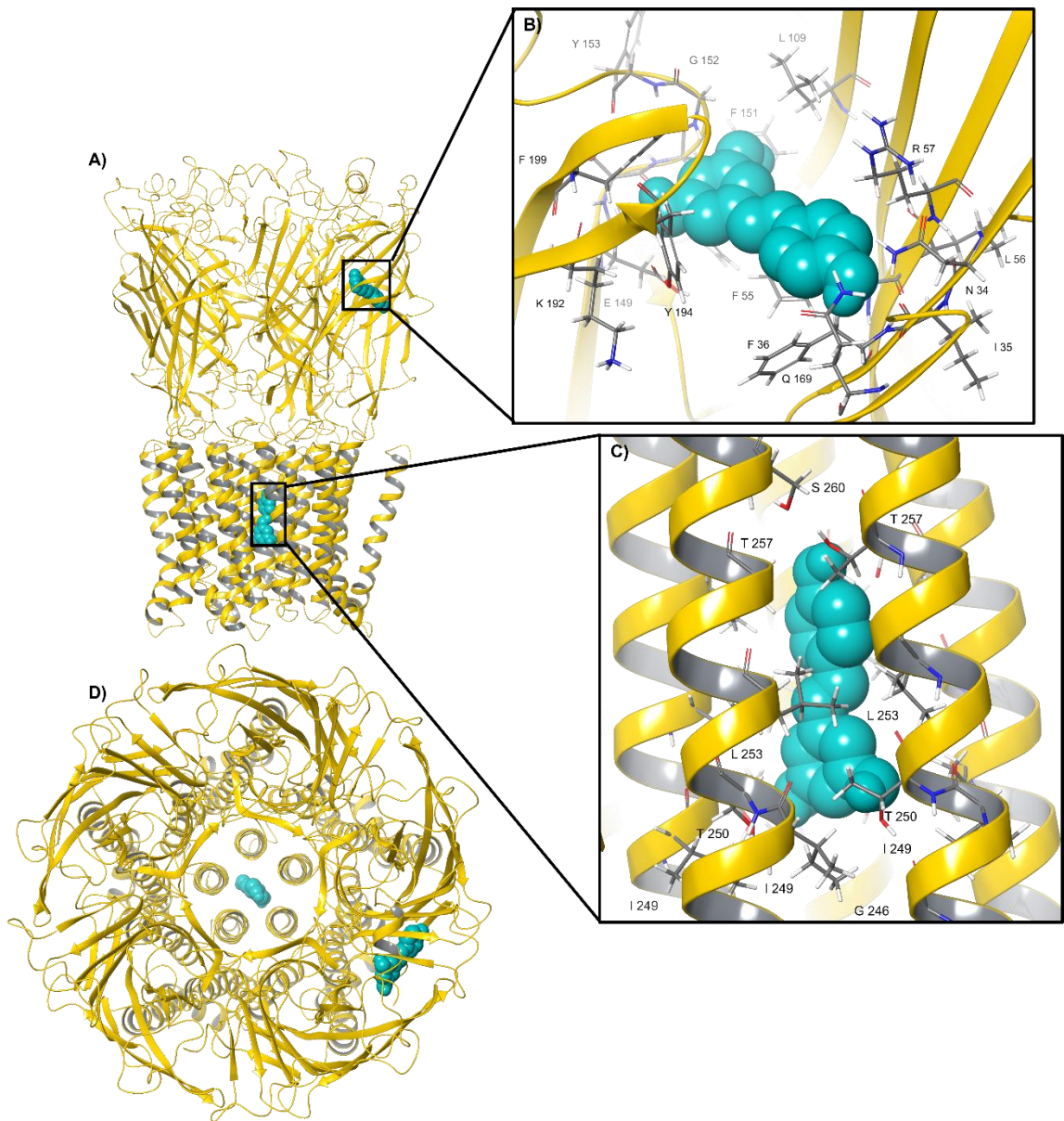


Figura 6: Docking sin restricción RGL α 1 conformación cerrada unida a RSV mediante Autodock Vina. A) Vista frontal del receptor de glicina alfa 1 en color amarillo y Resveratrol en color cian. B) Vista en detalle del complejo de unión con los respectivos aminoácidos y cadenas laterales que interaccionan en el bolsillo de unión de resveratrol en la región extracelular del receptor. C) Vista en detalle del complejo de unión con los respectivos aminoácidos y cadenas laterales en la región transmembrana del receptor. D) Vista superior del receptor.

1.2 Exploración de los potenciales sitios de unión de Resveratrol en RGLI α 2 mediante AutoDock Vina.

Para el modelamiento de RGLI α 2 se realizó el análisis con la estructura templada de *Danio rerio* en conformación abierta y cerrada, la cual fue humanizada por modelamiento por homología para construir un homopentámero tal como se realizó el modelamiento de la subunidad alfa 1.

Posteriormente, se realizó un docking sin restricción en el receptor de glicina. Obteniendo que resveratrol presenta mayor afinidad por situarse en 3 diferentes posiciones en el dominio extracelular (ECD) del receptor en conformación abierta, interactuando con diferentes aminoácidos.

En el complejo de unión 1 interactúa con ³⁴RI³⁵, ³⁹FK⁴⁰, P¹⁷, ²⁰FL²¹, ⁸⁵YP⁸⁶, D⁸⁷, L⁹⁰, L⁹², M⁹⁶ (**Figura 7B**), en el complejo de unión 2 interactúa con ⁶⁰GTTM⁶³, ¹⁰⁸AN¹⁰⁹, K¹¹¹, ¹⁴⁴SC¹⁴⁵ (**Figura 7C**), ¹⁴⁶PM¹⁴⁷, T¹⁶⁰, Q¹⁶², K²⁰⁷, ²⁸²PK²⁸³, ⁵³NSFGSV⁵⁸, ¹⁸⁶AEGLTLPQ¹⁹³, en el complejo de unión 3 interactúa con ¹⁰⁸AN¹⁰⁹, Q¹⁶², ²⁰⁷KHY²⁰⁹, F⁵¹, ⁵³NS⁵⁴, ¹⁸⁶AE¹⁸⁷ (**figura 7D**).

Sin embargo, en estadio cerrado, resveratrol muestra afinidad por dos sitios diferentes en el receptor, pero sorprendentemente el complejo de unión 1 de resveratrol R³⁴, D¹⁰⁴, F¹⁰⁶, A¹⁰⁸, ¹⁶⁴ESFGY¹⁶⁸, K²⁰⁷, Y²⁰⁹, T²¹¹, F²¹⁴, ⁴⁹NIF⁵¹, N⁵³, ⁷⁰FLR⁷², ⁹²LDP⁹⁴, T¹²⁰, ¹²³KLLR¹²⁶, L¹³⁴, S¹³⁶, R¹³⁸, Q¹⁸⁴, A¹⁸⁶ (**Figura 8C**), es casi idéntico al que presenta en alfa 1. Por otro lado, el complejo de unión 2 presenta los siguientes aminoácidos en su bolsillo de unión a resveratrol ⁹¹DLDP⁹⁵, T¹²⁰, ¹²³KLLR¹²⁶, A³⁵, R³⁴, R³⁶, F³⁹, D⁹⁸, ¹⁰⁰IWK¹⁰², D¹⁰⁴, ¹⁶⁷GYT¹⁶⁹, ¹⁷¹ND¹⁷² (**Figura 8B**).

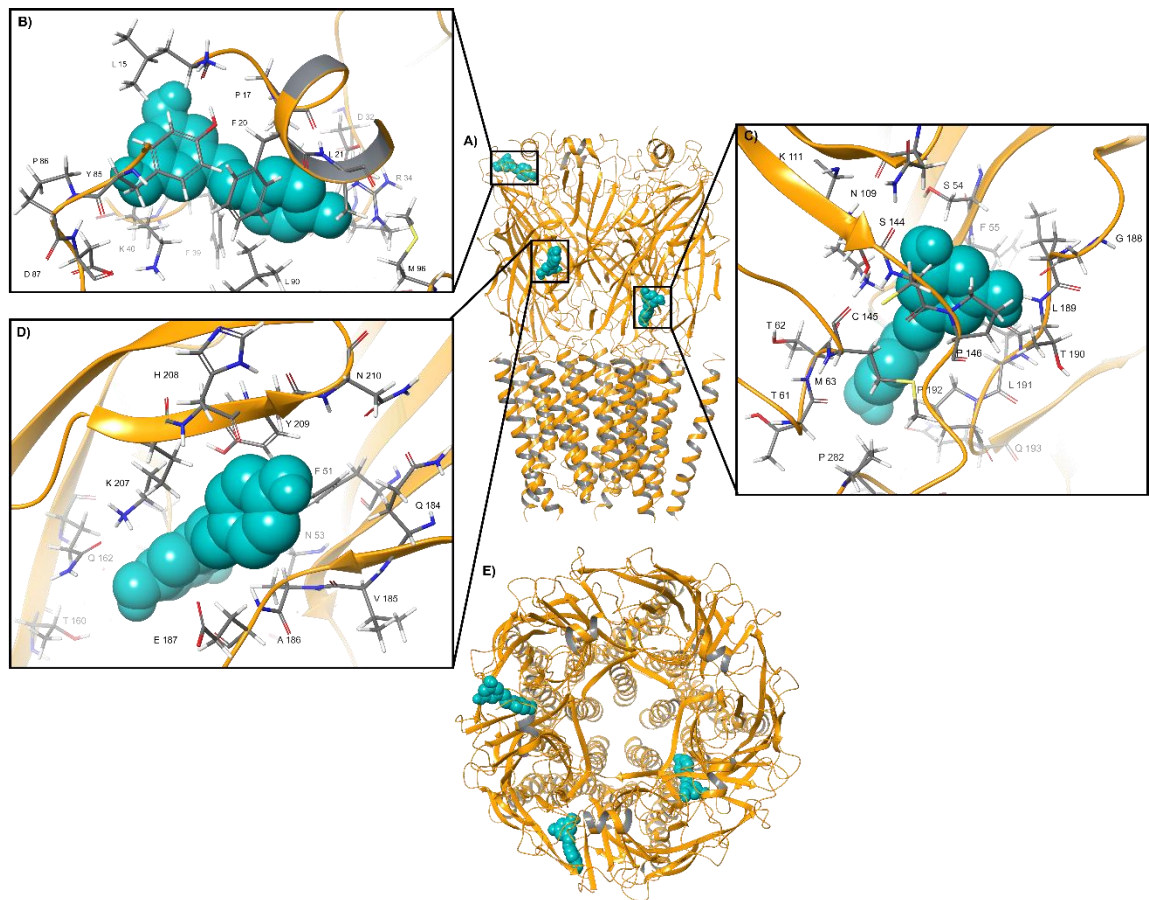


Figura 7: Docking sin restricción RGLi $\alpha 2$ conformación abierta unida a RSV mediante Autodock Vina. A) Vista frontal del receptor de glicina alfa 2 en color damasco y Resveratrol en color cian. (B), (C) y (D) Vista en detalle del complejo de unión con los respectivos aminoácidos y cadenas laterales que interaccionan en el bolsillo de unión de resveratrol en la región del anillo superior del ECD del receptor. E) Vista superior del receptor.

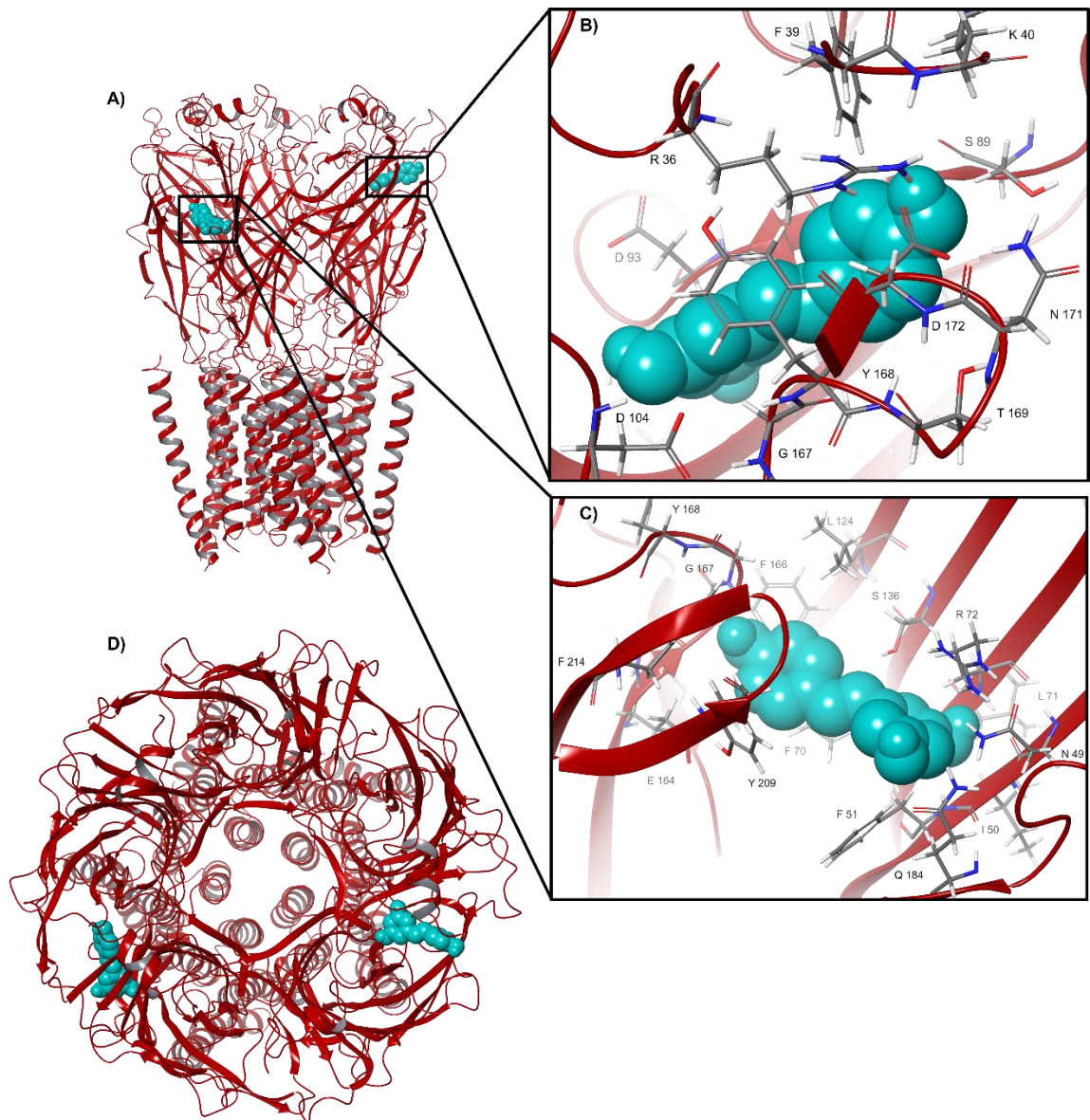


Figura 8: Docking sin restricción RGl α 2 conformación cerrada unida a RSV mediante Autodock Vina. A) Vista frontal del receptor de glicina alfa 2 en color rojo y Resveratrol en color cian. (B) y (C) Vista en detalle del complejo de unión con los respectivos aminoácidos y cadenas laterales que interaccionan en el bolsillo de unión de resveratrol en la región extracelular del receptor. D) Vista superior del receptor.

1.3 Exploración de los potenciales sitios de unión de Resveratrol en RGLi α 3 mediante AutoDock Vina.

Para RGLi α 3 el análisis se realizó con la estructura *Homo sapiens* en conformación abierta y cerrada, comenzando con la realización de un docking sin restricción en el receptor de glicina. Obteniendo que en la conformación abierta de RGLi α 3, resveratrol presenta mayor afinidad por situarse en 2 diferentes posiciones en el dominio extracelular (ECD) interactuando con diversos aminoácidos localizados en el bolsillo de unión. En el complejo de unión 1 interactúa con ⁴⁷SFGS⁵⁰, R⁵⁹, N⁶¹, H¹⁰⁹, R¹³¹, T¹³³, ¹⁸⁴LP¹⁸⁵, ⁵⁵TM⁵⁶, ¹⁰²NEK¹⁰⁴, S¹³⁷, P¹³⁹ (**Figura 9B**), mientras que el complejo de unión 2 interactúa con ²⁷RIR²⁹, ³²FK³³, W⁹⁴, Y¹⁶¹, D¹⁶⁵, ⁷PM⁸, P¹⁰, ¹³FL¹⁴, Y⁷⁸, ⁸³LDL⁸⁵ (**figura 9C**).

Por otra parte, cuando analizamos la modalidad cerrada del receptor, resveratrol muestra afinidad por dos sitios diferentes en el receptor, pero sorprendentemente el complejo de unión 1 de resveratrol D⁹⁷, F⁹⁹, Y²⁰², F²⁰⁷, F⁴⁴, F⁶³, D⁸⁴, ⁸⁶DP⁸⁷, ¹¹³TDNKL¹¹⁷, R¹¹⁹, S¹²⁹, Q¹⁷⁷ (**Figura 10B**), es casi idéntico al que presenta en alfa 1 y en alfa 2. Mientras que el complejo 2 presenta los siguientes aminoácidos en su bolsillo de unión a resveratrol ²⁷RIR²⁹, F³², D⁹⁷, F⁹⁹, ¹⁵⁷ESFGY¹⁶¹, Y²⁰², F²⁰⁷, C¹⁰, D⁸⁴, P⁸⁷, ¹¹³TDNKL¹¹⁷, R¹¹⁹, S¹²⁹ (**figura 10C**).

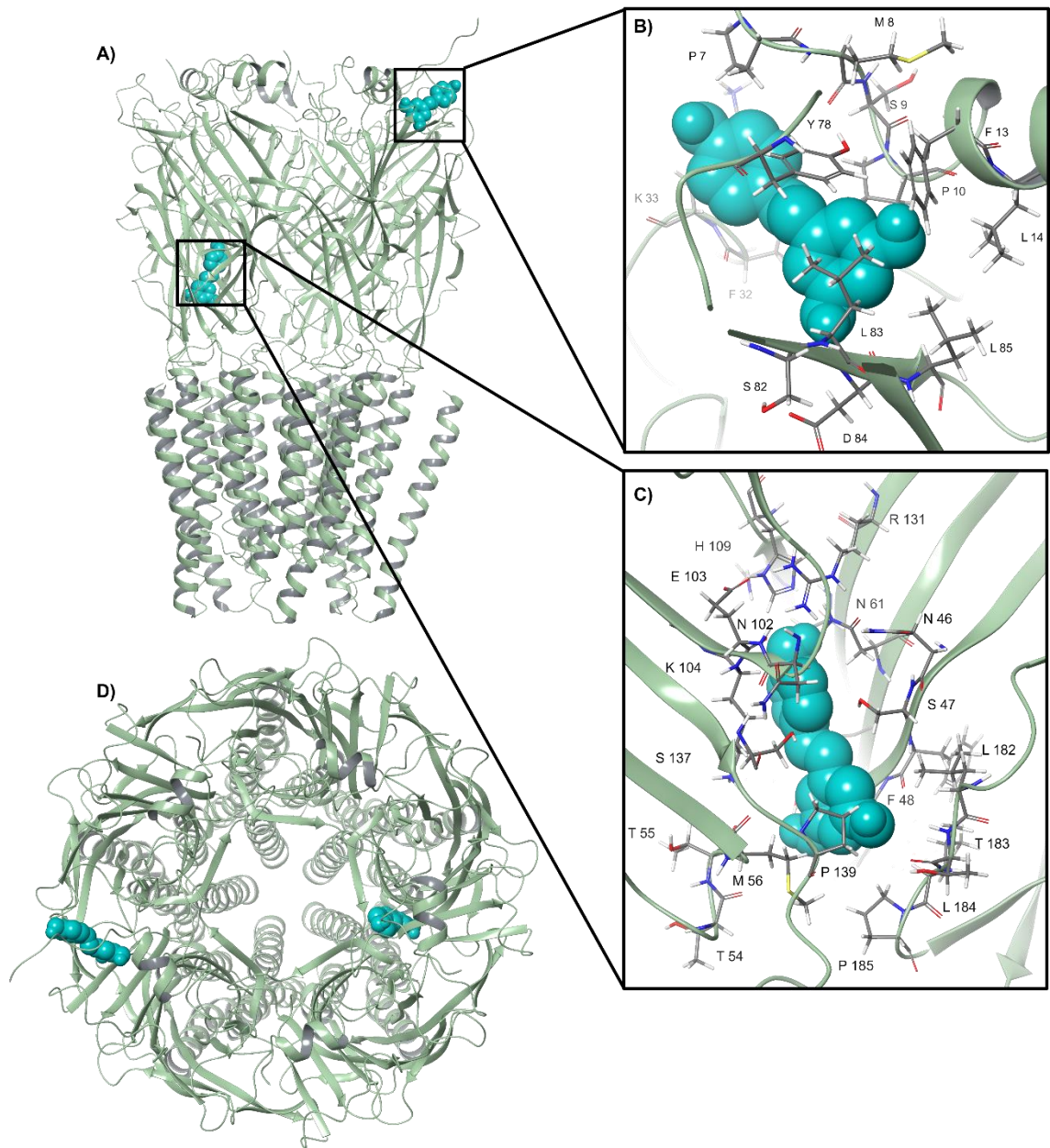


Figura 9: Docking sin restricción RGI α 3 conformación abierta unida a RSV mediante Autodock Vina. A) Vista frontal del receptor de RGI α 3 en color verde y Resveratrol en color cian. (B) y (C) Vista en detalle del complejo de unión con los respectivos aminoácidos y cadenas laterales que interactúan en el bolsillo de unión de RSV en la región ECD del receptor. D) Vista superior del receptor.

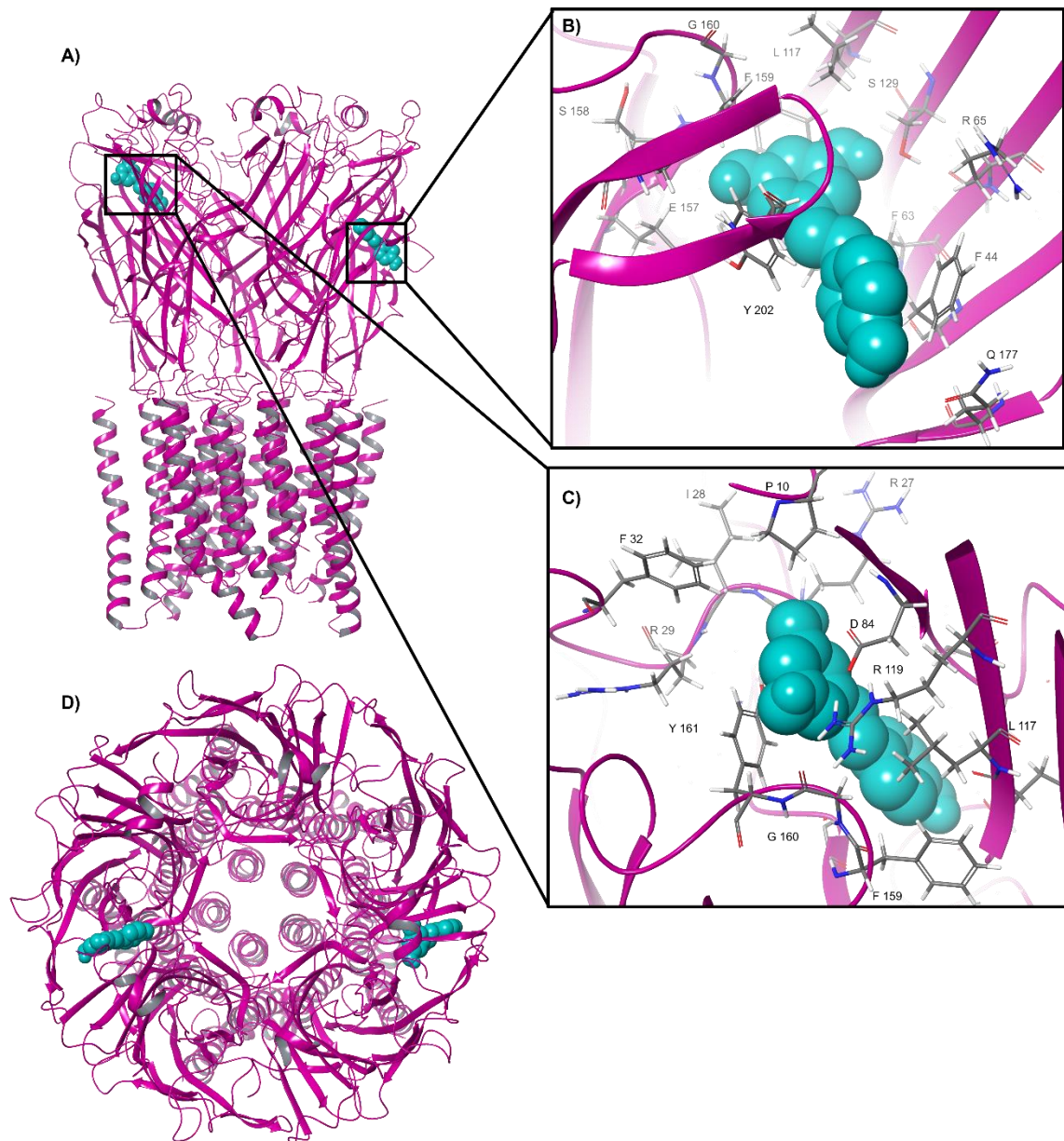


Figura 10: Docking sin restricción RGLi α 3 conformación cerrada unida a RSV mediante Autodock Vina. A) Vista frontal del receptor de RGLi α 3 en color magenta y Resveratrol en color cian. (B) y (C) Vista en detalle del complejo de unión con los respectivos aminoácidos y cadenas laterales que interaccionan en el bolsillo de unión de RSV en la región ECD del receptor. D) Vista superior del receptor.

1.4 Caracterización estructural y energética de los complejos de unión de resveratrol en el receptor de glicina mediante Maestro.

Para determinar las propiedades energéticas de cada uno de los complejos de unión de resveratrol en el receptor de glicina en conformación abierta y cerrada, se realizó un docking dirigido mediante el programa Glide. Se fabricaron grillas del tamaño de la molécula de RSV situados en cada uno de los complejos descritos anteriormente. Este docking sitio-dirigido entrega como resultado la posición y orientación más afín ligando-receptor en estudio.

Luego, mediante Glide se evaluó el docking score para cada uno de los complejos, resultando un docking score negativo en todos los sitios de los complejos descritos en los apartados anteriores, repitiéndose esta información en todas las subunidades del receptor de glicina, el cual varía entre -5.2 a -7.1 y el ΔG de unión calculado con Prime que varía entre -29.58 a -60.71 kcal/mol (**Tabla 1**). El programa Maestro proporciona un diagrama de interacción de resveratrol con los aminoácidos que formarían el bolsillo de unión de la molécula en cada uno de los sitios estudiados en el receptor de glicina, como en la subunidad $\alpha 1$ (**Figura 11**), subunidad $\alpha 2$ (**Figura 12 y 13**) y subunidad $\alpha 3$ (**Figura 14 y 15**). Observando que las posiciones de resveratrol en cada uno de los sitios de unión de las subunidades estudiadas en Glide coinciden con las obtenidas anteriormente en Autodock Vina.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos los cuales fueron rankeados según docking score más negativo para cada subunidad del receptor de glicina, se concluyó que la molécula de resveratrol presenta mayor afinidad por formar un complejo de unión entre subunidades en el ECD del receptor de glicina tanto en conformación abierta como en conformación cerrada. De manera interesante, cuando se analiza al receptor de glicina en conformación cerrada, resveratrol presenta mayor afinidad por situarse en zonas muy cercanas al bolsillo de unión a glicina entre las subunidades. Sin embargo, para observar los efectos de

resveratrol en el receptor de glicina, se realizaron estudios electrofisiológicos en homopentámeros y heteropentámeros de RGli.

Propiedades energéticas del docking dirigido RGli α_1 , α_2 y α_3 .

RGli	Conformación	Complejo de unión	ΔG unión (kcal/mol)	Docking Score
α_1	Abierta	1	-43.56	-7.159
α_1	Cerrada	1	-44.83	-6.247
α_1	Cerrada	2	-29.58	-6.388
α_2	Abierta	1	-40.98	-6.406
α_2	Abierta	2	-60.71	-6.352
α_2	Abierta	3	-40.15	-5.880
α_2	Cerrada	1	-43.06	-7.792
α_2	Cerrada	2	-48.88	-6.988
α_3	Abierta	1	-60.14	-5.622
α_3	Abierta	2	-45.99	-5.231
α_3	Cerrada	1	-39.67	-7.176
α_3	Cerrada	2	-45.14	-6.107

Tabla 1. Valores energéticos de las subunidades α_1 , α_2 y α_3 de RGli. Considerando que mientras más negativo es el valor del docking Score y ΔG de unión, más fuerte y estable será el complejo proteína-ligando. Los valores energéticos de docking score estuvieron entre el rango obtenido para glicina y estricnina reportado en bibliografía (78).

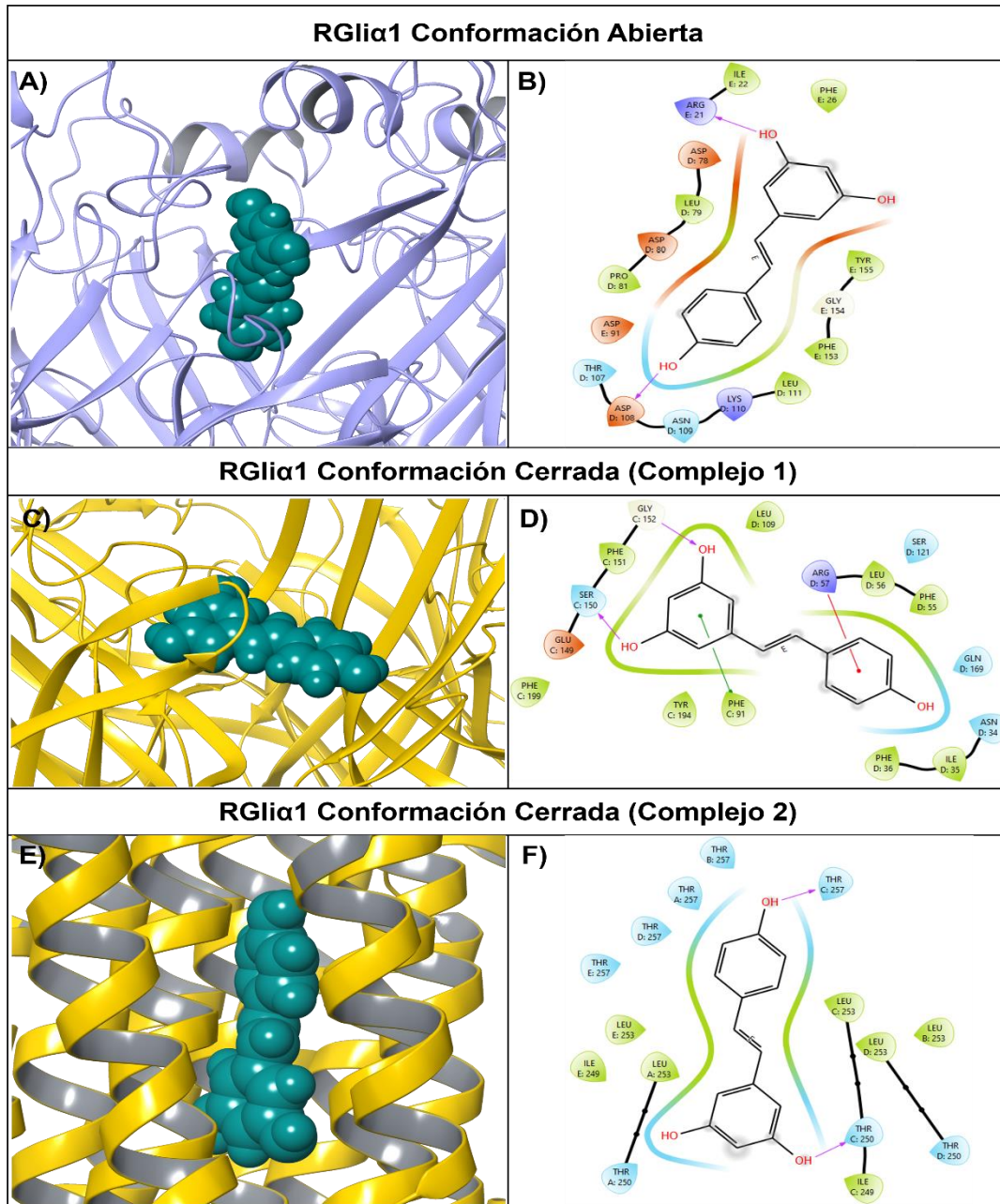


Figura 11: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGli α 1. A) Resveratrol en RGli α 1 conformación abierta. B) Diagrama de interacción proteína-ligando RGli α 1 conformación abierta. (C) y (E) Resveratrol en RGli α 1 conformación cerrada. (D) y (F) Diagrama de interacción proteína-ligando RGli α 1 conformación cerrada.

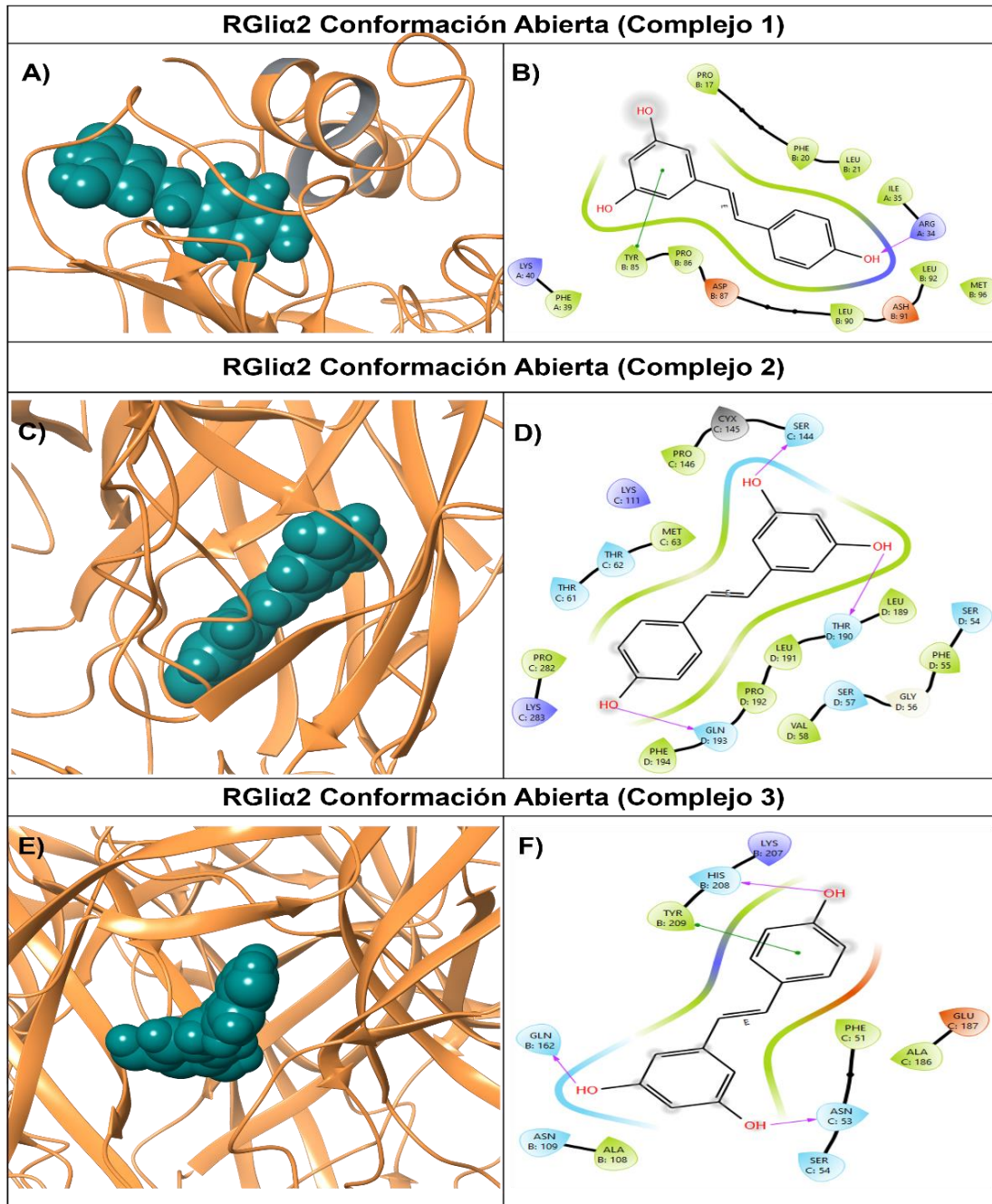


Figura 12: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGli α 2. (A) (C) y (E) Resveratrol en RGli α 2 conformación abierta. (B) (D) y (F) Diagrama de interacción proteína-ligando RGli α 2 conformación abierta.

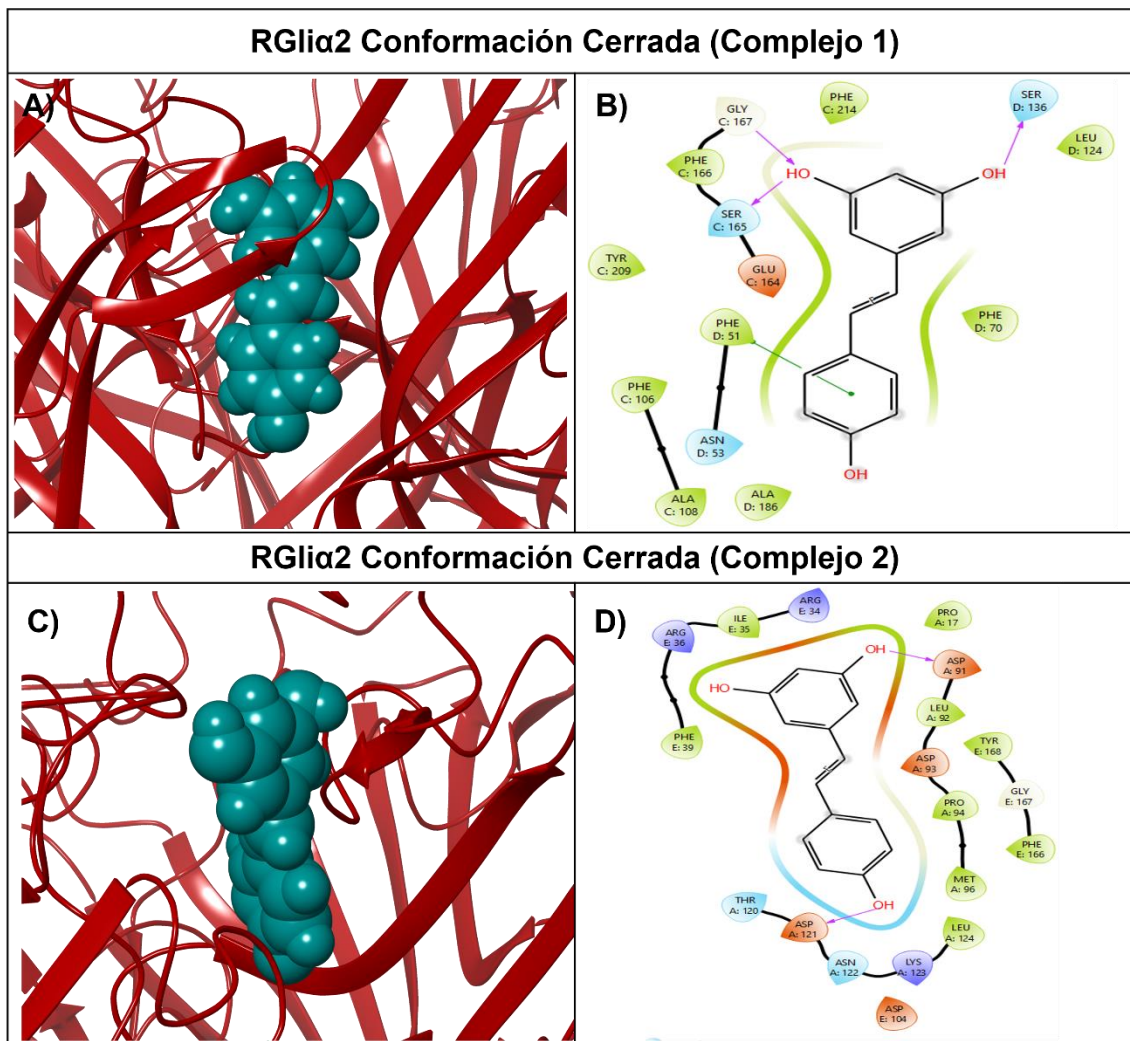


Figura 13: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGli α 2. (A) y (C) Resveratrol en RGli α 2 conformación cerrada. (B) y (D) Diagrama de interacción proteína-ligando RGli α 2 conformación cerrada.

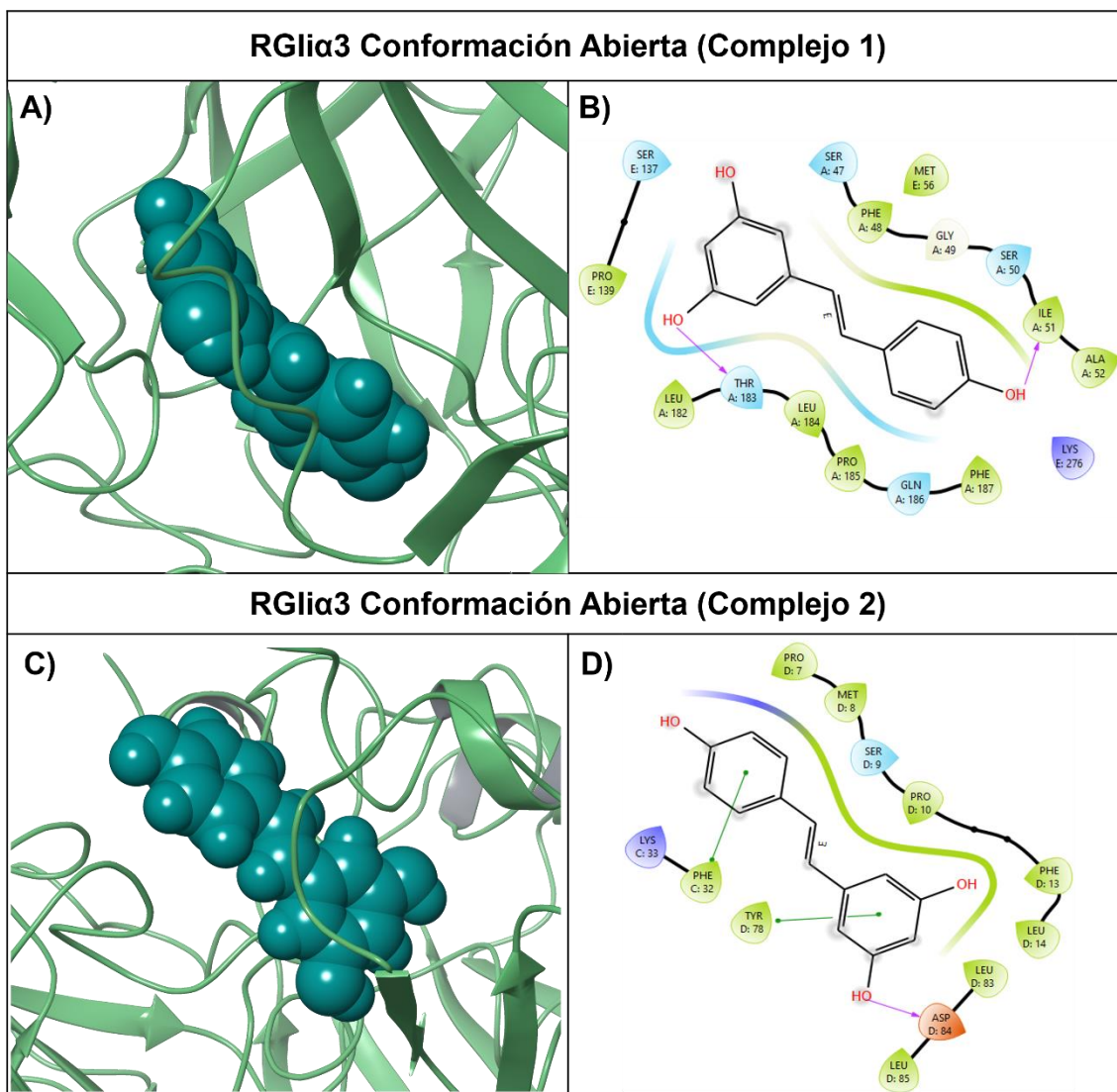


Figura 14: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGI α 3. (A) y (C) Resveratrol en RGI α 3 conformación abierta. (B) y (D) Diagrama de interacción proteína-ligando RGI α 3 conformación abierta.

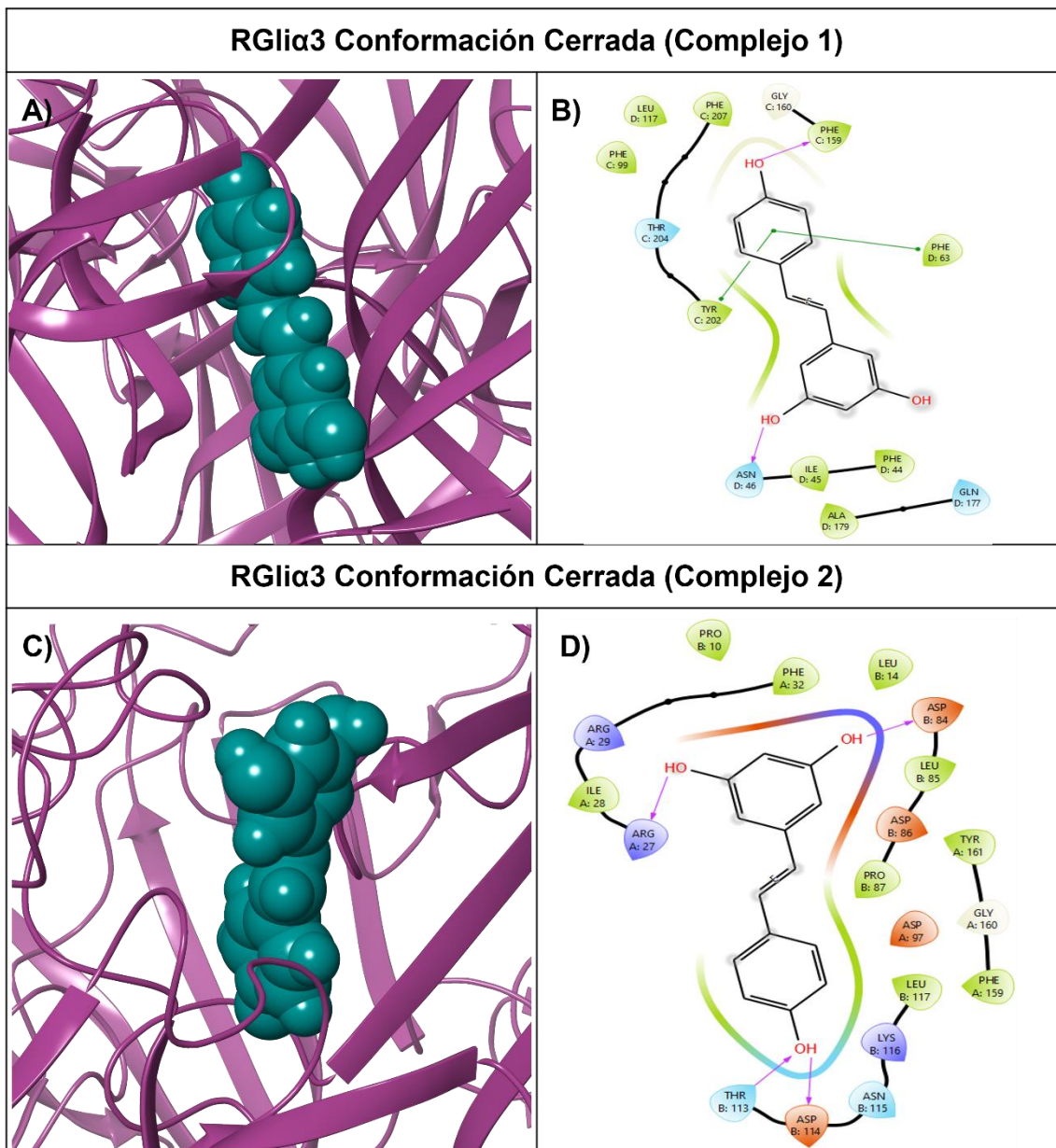


Figura 15: Caracterización estructural y diagrama de interacción de Resveratrol RGli α 3. (A) y (C) Resveratrol en RGli α 3 conformación cerrada. (B) y (D) Diagrama de interacción proteína-ligando RGli α 3 conformación cerrada.

2. Determinación de los efectos moduladores de resveratrol sobre la función de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGli mediante registros electrofisiológicos.

2.1 Sensibilidad del receptor RGli alfa 1 a resveratrol.

Se realizaron curvas concentración-respuesta del receptor $\alpha 1$ y $\alpha 1\beta$ en células HEK293 que expresaron funcionalmente el receptor de glicina. Para la elaboración de las curvas concentración-respuesta se utilizó una concentración creciente de glicina (1-100 μ M), los EC_{50} para $\alpha 1$ calculado fue de $35\pm 5\mu$ M (**Figura 16**) mientras que para $\alpha 1\beta$ fue de $37\pm 6\mu$ M (**Figura 17**). Para confirmar la expresión de $\alpha 1\beta$ se co-aplicó glicina 100 μ M y picrotoxina (PTX 20 μ M), ya que PTX inhibe al receptor de glicina en menor porcentaje (menos del 50%) cuando la subunidad beta está presente, es decir, en conformación heteropentamérica (**Figura 17B**) (79-81).

A partir de la curva de concentración-respuesta, se utilizó 100 μ M de glicina (correspondiente a EC_{80} para $\alpha 1$ y un EC_{90} para $\alpha 1\beta$), con el propósito de evaluar los efectos de resveratrol con concentraciones crecientes 0,01-800 μ M en RGli $\alpha 1$ co-aplicado con glicina (100 μ M) (**Figura 18**) y de 0.1 μ M-1000 μ M en RGli $\alpha 1\beta$ (Figura 15) co-aplicado con glicina (100 μ M). La curva de concentración-respuesta a resveratrol mostró que la molécula inhibe la corriente de cloruro activada por Glicina, la máxima inhibición en RGli $\alpha 1$ se alcanzó utilizando la máxima concentración aplicada de RSV (800 μ M), con lo que se consiguió una inhibición de alrededor del 74%. Sin embargo, en $\alpha 1\beta$ la máxima inhibición se alcanzó utilizando 1000 μ M de RSV que fue la concentración máxima aplicada, con lo que se consiguió una inhibición de alrededor del 95% (**Figura 19**).

Los IC_{50} obtenidos fueron de $174\pm 42\mu$ M para RGli $\alpha 1$ y $69\pm 16\mu$ M para RGli $\alpha 1\beta$ (**Tabla 3**).

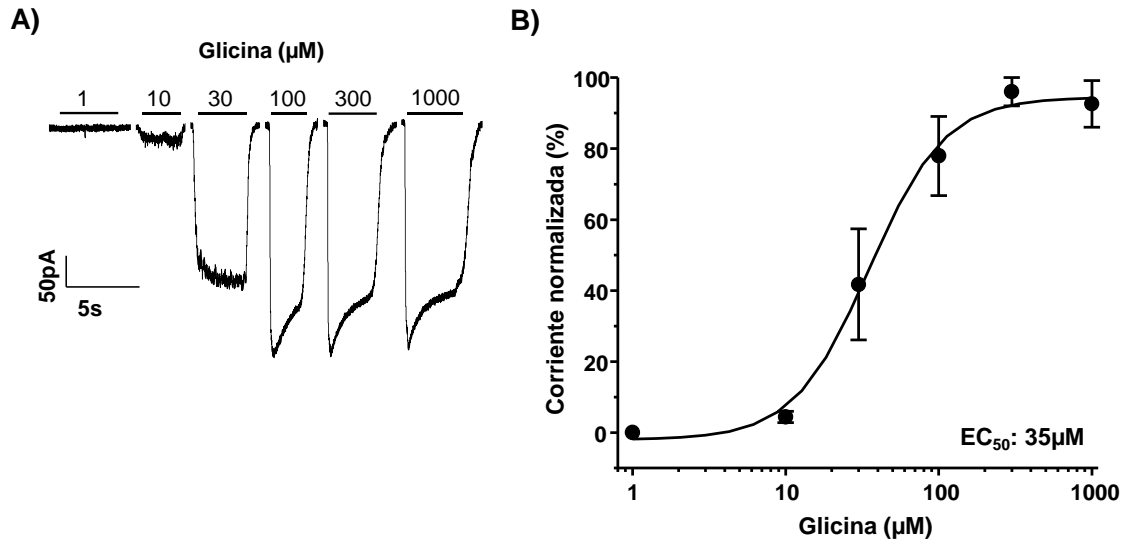


Figura 16: Curva concentración respuesta RGLi α 1 en células HEK293. A) Trazos representativos RGLi α 1 activados por concentraciones crecientes de glicina (1-1000 μ M). B) Grafico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de glicina.

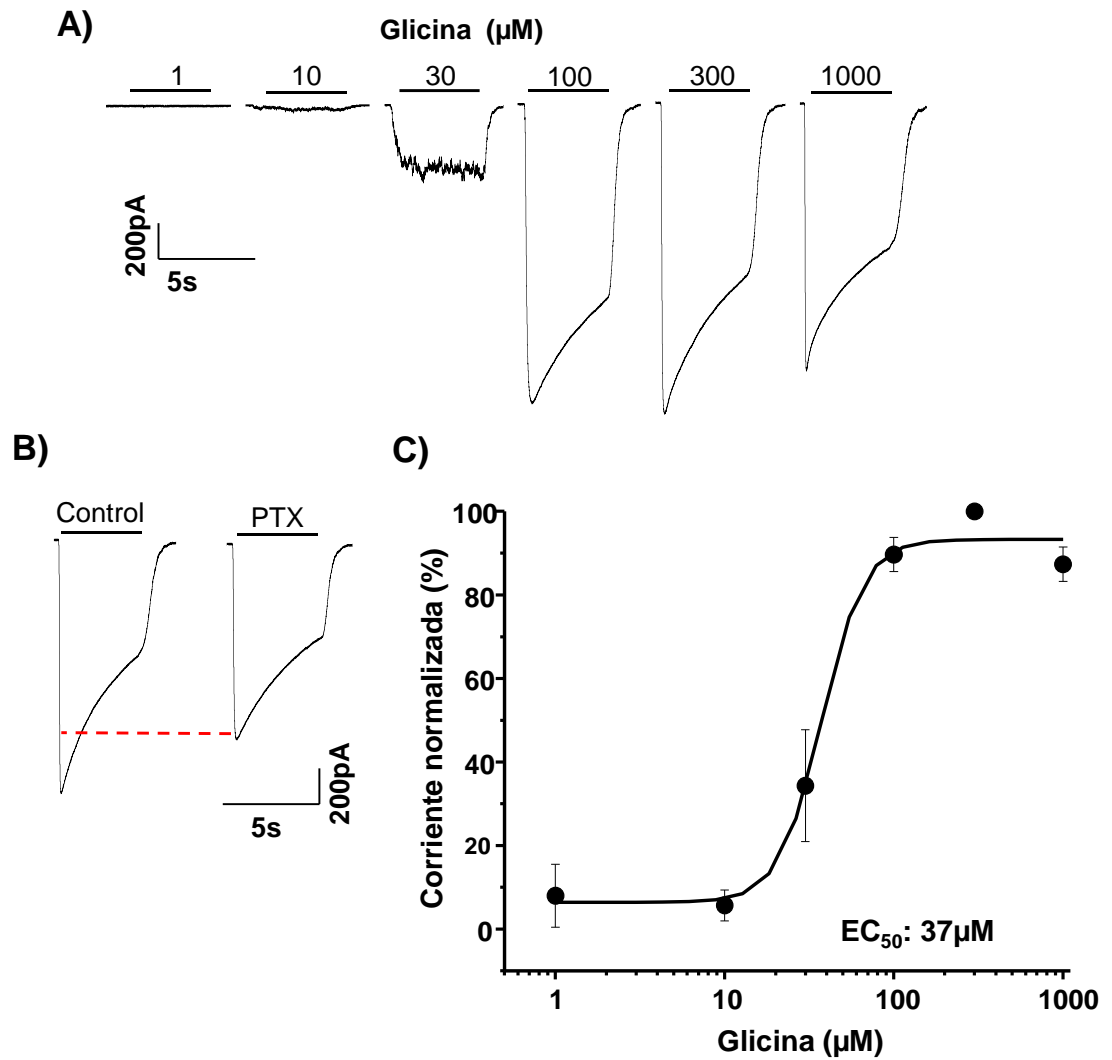


Figura 17: Curva concentración respuesta RGLi α 1 β en células HEK293. A) Trazos representativos RGLi α 1 β activados por concentraciones crecientes de glicina (1-1000 μM). B) Corriente representativa de glicina 100 μM (control) y picrotóxina (PTX 20 μM). C) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de glicina.

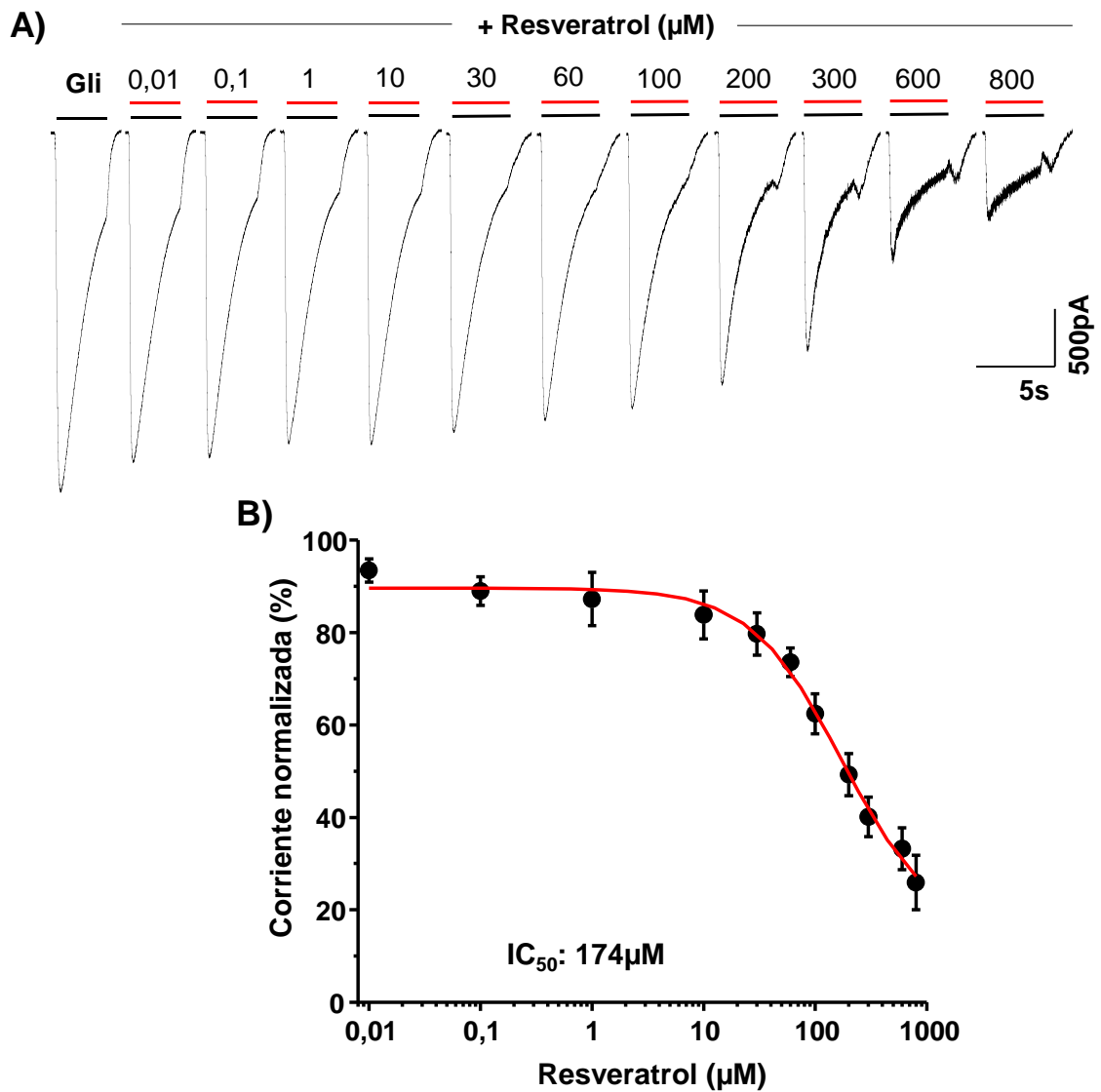


Figura 18: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina ($100\mu\text{M}$) en $\text{RGli}\alpha 1$ expresados en células HEK293. A) Trazos representativos de $\text{RGli}\alpha 1$ por glicina $100\mu\text{M}$ sometidas a diferentes concentraciones de resveratrol ($0,01 - 800\mu\text{M}$). B) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de RSV en $\text{RGli}\alpha 1$ frente a la función de glicina.

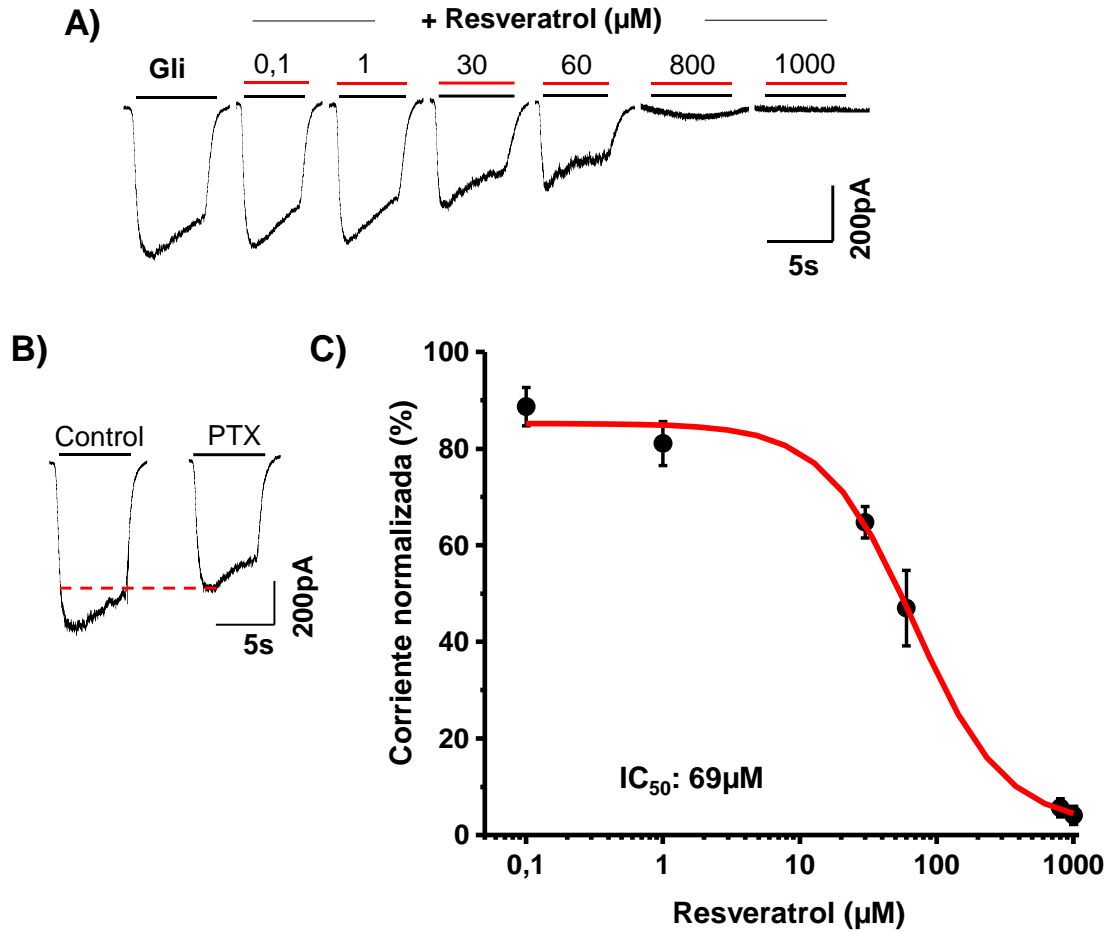


Figura 19: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGLi α 1 β expresados en células HEK293. A) Trazos representativos de RGLi α 1 β por glicina 100 μ M sometidas a diferentes concentraciones de resveratrol (0.1 – 1000 μ M). B) Corriente representativa de glicina 100 μ M (control) y picrotóxina (PTX 20 μ M). C) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de RSV en RGLi α 1 β frente a la función de Glicina.

2.2 Sensibilidad del receptor RGLi alfa 2 a resveratrol.

Se realizaron curvas concentración-respuesta del receptor α 2 y α 2 β en células HEK293 que expresaron funcionalmente el receptor de glicina. Para la elaboración de las curvas concentración-respuesta se utilizó una concentración

creciente de glicina (1-100 μ M), los EC₅₀ para α 2 calculado fue de 124 \pm 13 μ M (**Figura 20**), y para α 2 β fue de 156 \pm 9 μ M (**Figura 21**). Para confirmar la expresión de α 2 β se co-aplicó glicina 100 μ M y picrotoxina (PTX 20 μ M) (**Figura 21B**) (79-81).

A partir de la curva de concentración respuesta, se utilizó 100 μ M de glicina (correspondiente a los valores de EC₄₅ α 2 y un EC₃₅ α 2 β), con el propósito de evaluar los efectos de resveratrol con concentraciones crecientes de 0,01 μ M a 800 μ M en α 2 co-aplicado con glicina (100 μ M) (**Figura 22**) y de 0.1 μ M a 1000 μ M en α 2 β co-aplicado con glicina (100 μ M) (**Figura 23**). La curva de concentración-respuesta a resveratrol mostró que la molécula inhibe la corriente de cloruro activada por glicina, la máxima inhibición en RGLi α 2 se alcanzó utilizando la concentración máxima de RSV aplicada (800 μ M), con lo que consiguió una inhibición de alrededor del 96%. Sin embargo, en α 1 β la máxima inhibición se alcanzó utilizando la máxima concentración aplicada de RSV (1000 μ M), con lo que se consiguió una inhibición de alrededor del 95%.

Los IC₅₀ obtenidos fue de 68 μ M \pm 13 para α 2 y 67 μ M \pm 11 para α 2 β (**Tabla 3**).

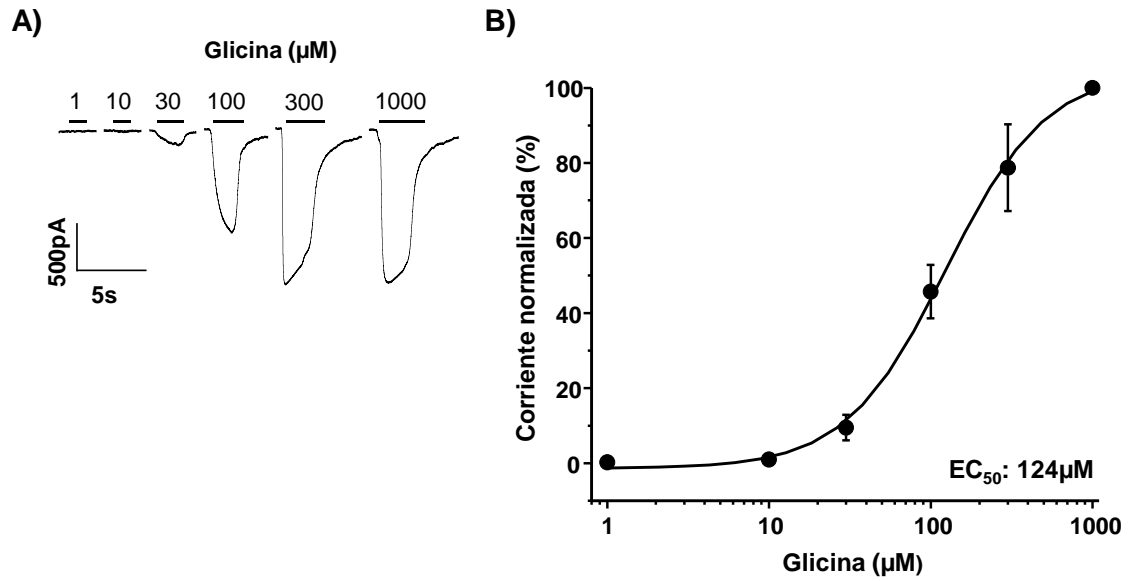


Figura 20: Curva concentración respuesta en RGLi α 2 transfectado en células HEK293. A) Trazos representativos RGLi α 2 activados por concentraciones crecientes de glicina (1-1000 μ M). B) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de glicina.

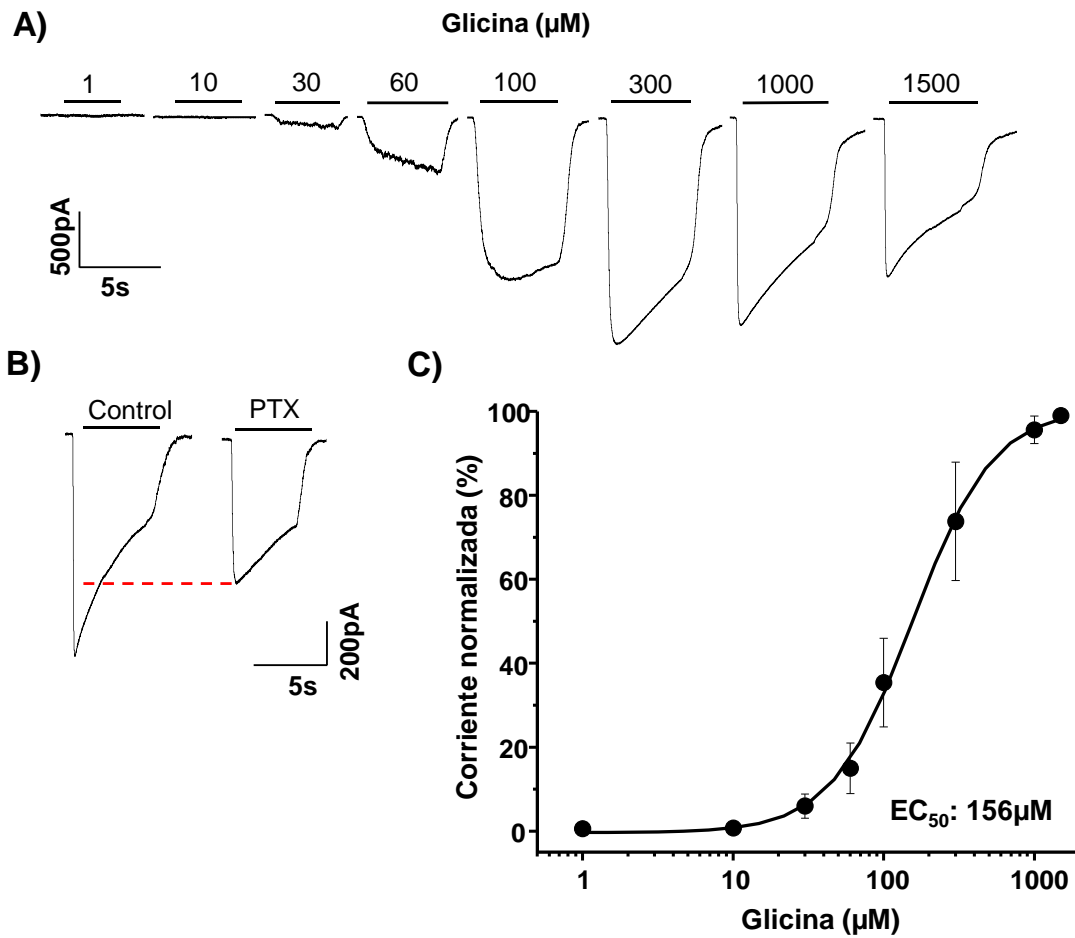


Figura 21: Curva concentración respuesta en RGLi α 2 β expresados en células HEK293. A) Trazos representativos RGLi α 2 activados por concentraciones crecientes de glicina (1-1500 μ M). B) Corriente representativa de glicina 100 μ M (control) y picrotoxina (PTX 20 μ M). C) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de glicina en RGLi α 2 β .

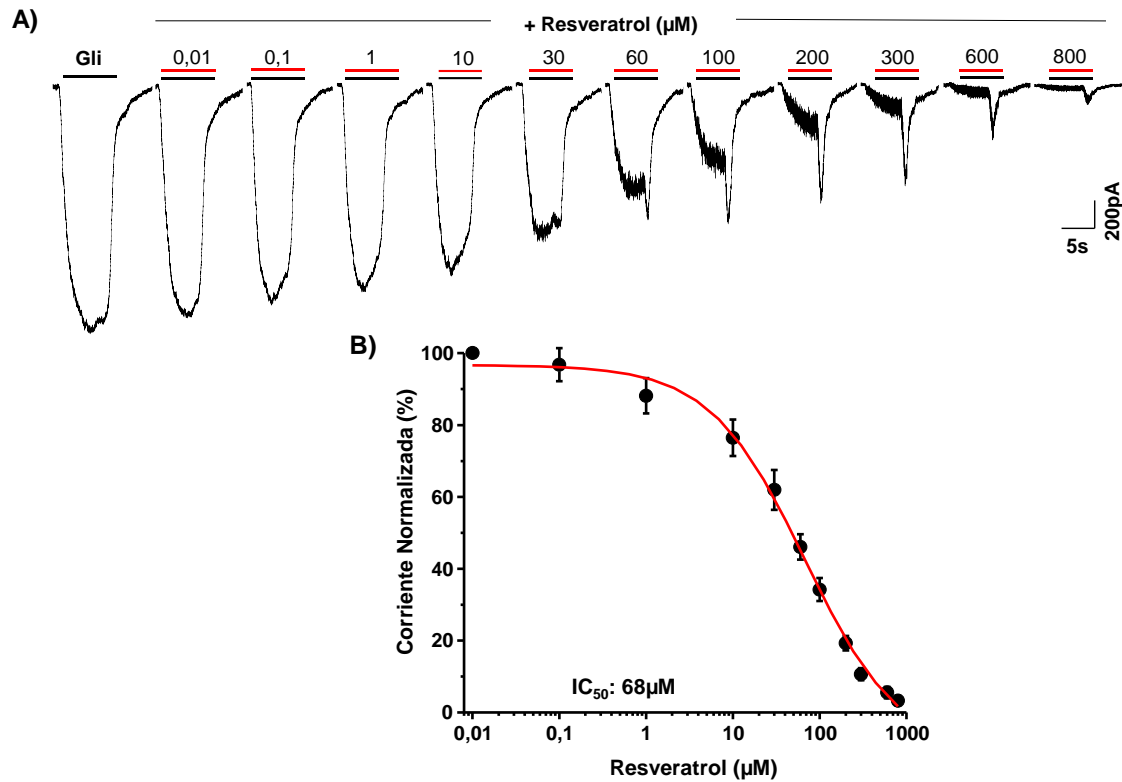


Figura 22: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGLi α 2 expresados en células HEK293. A) Trazos representativos de RGLi α 2 por glicina 100 μ M sometidas a diferentes concentraciones de resveratrol (0.01 – 800 μ M). B) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de RSV en RGLi α 2 frente a la función de glicina.

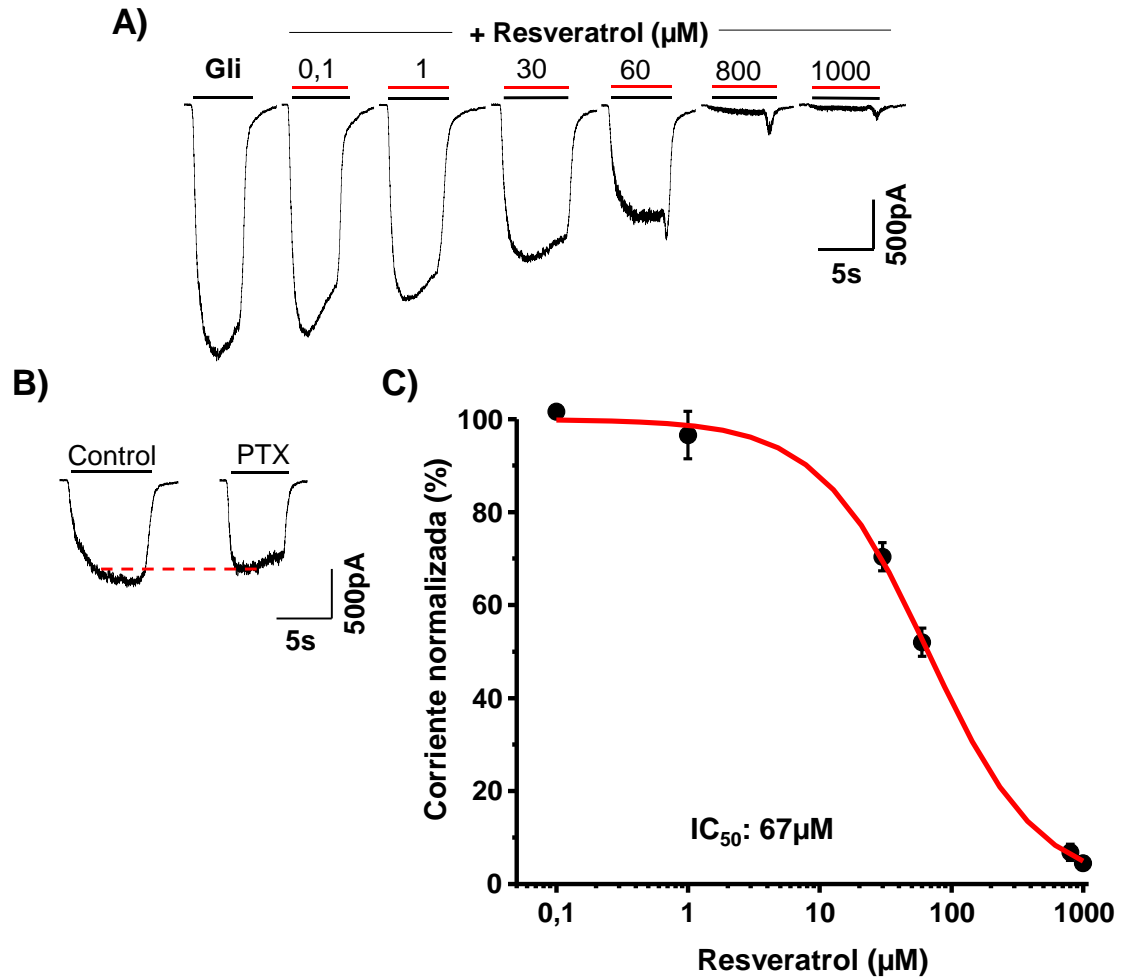


Figura 23: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGLi α 2 β expresados en células HEK293. A) Trazos representativos de RGLi α 2 β por glicina 100 μ M sometidas a diferentes concentraciones de resveratrol (0.1 – 1000 μ M). B) Corriente representativa de glicina 100 μ M (control) y en presencia de picrotoxina (PTX 20 μ M). C) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de RSV en RGLi α 2 β frente a la función de glicina.

2.3 Sensibilidad del receptor RGl α 3 a resveratrol.

Se realizaron curvas concentración-respuesta del receptor α 3 en células HEK293 que expresaron funcionalmente el receptor de glicina. Para la elaboración de las curvas concentración-respuesta se utilizó una concentración creciente de glicina (1-100 μ M) y los EC₅₀ para α 3 calculado fue de 151 \pm 9 μ M (**Figura 24**) (**Tabla 2**).

A partir de la curva de concentración-respuesta, se obtuvo el valor de EC₂₅ para α 3 con el fin de evaluar los efectos de resveratrol con concentraciones crecientes de 0,01 μ M a 600 μ M co-aplicado con glicina (100 μ M) (**Figura 25**). La curva de concentración-respuesta a resveratrol mostró que la molécula inhibe la corriente de cloruro activada por glicina, la máxima inhibición en RGl α 3 se alcanzó utilizando 600 μ M de RSV, con lo que consiguió una inhibición de alrededor del 96%.

El IC₅₀ obtenido fue de 98 \pm 39 μ M para RGl α 3 (**Tabla 3**).

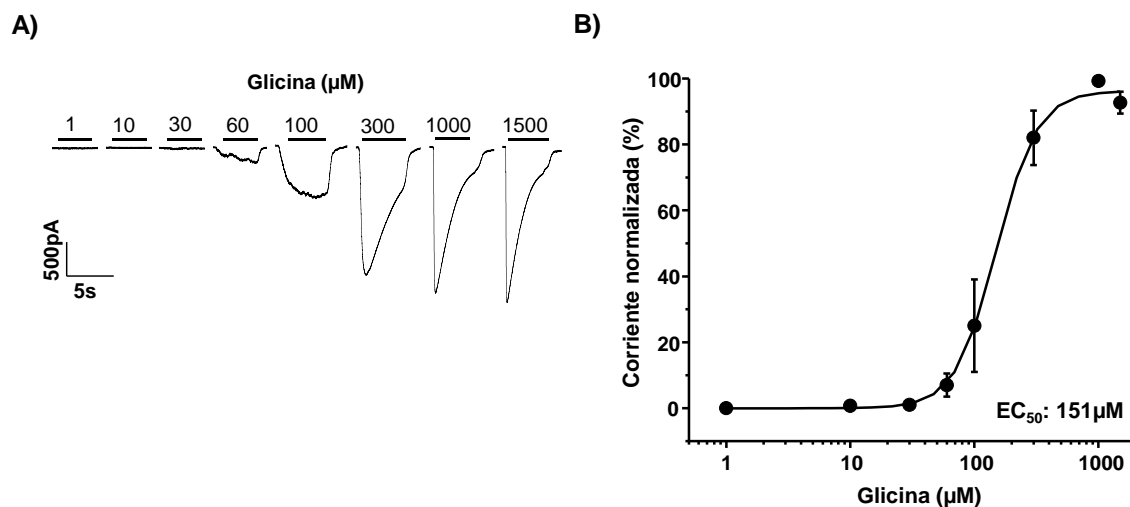


Figura 24: Curva concentración respuesta RGl α 3 en células HEK293. A) Trazos representativos RGl α 3 activados por concentraciones crecientes de glicina (1-1000 μ M). B) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de diferentes concentraciones de glicina.

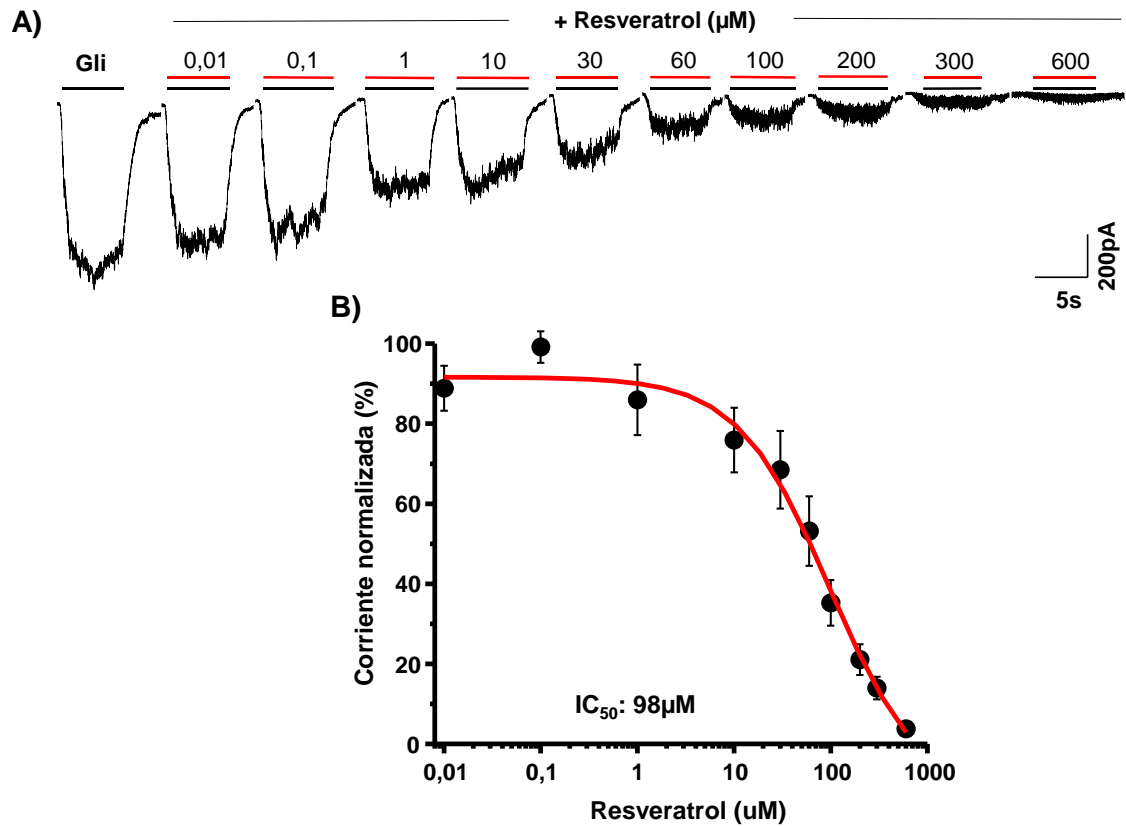


Figura 25: Efecto de Resveratrol sobre corrientes evocadas por glicina de RGLi α 3 expresados en células HEK293. A) Trazos representativos de RGLi α 3 por glicina 100 μ M sometidas a diferentes concentraciones de resveratrol (0.01 – 600 μ M). B) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas de concentraciones crecientes de RSV en RGLi α 3.

Tabla 1 Resumen valores EC₅₀ de RGli

RGli	Glicina EC ₅₀ (μM)	n _H	n
α ₁	35±5	1.77±0.38	3
α ₂	124±13	1.40±0.18	4
α ₃	151±9	2.62±0.25	4
α ₁ β	37±7	3.44±2.39	3
α ₂ β	156±9	1.62±0.12	5

Tabla 2 Resumen valores IC₅₀ de la modulación de RGli por resveratrol

RGli	IC ₅₀ (μM)	n _H	Modulación máxima (%)	Concentración modulación máxima (μM)	n
α ₁	174±41	1.06±0.17	-74.11±5.90	800	10
α ₂	68±13	0.79±0.10	-96.77±1.38	800	7
α ₃	98±39	0.91±0.21	-96.22±0.83	600	7
α ₁ β	69±16	1.31±0.47	-95.92±1.88	1000	11
α ₂ β	67±11	1.04±0.21	-95.57±11.32	1000	12

2.4 Evaluación del cambio de la afinidad aparente RGli α1 por resveratrol.

Con el fin de dilucidar el mecanismo de acción que presenta el fitopolifenol en la inhibición de las corrientes glicinérgicas generadas tras la activación de RGli, se evaluó el efecto por medio de confección de curvas concentración-respuesta de corrientes evocadas por el receptor de glicina en presencia de resveratrol (100μM) y se comparó con las corrientes glicinérgicas en ausencia de RSV.

A partir de la curva concentración-respuesta a resveratrol se obtuvo el IC₆₅ para α1 y se evaluó el efecto de resveratrol en el desplazamiento de la curva de concentración-respuesta a glicina co-aplicando concentraciones crecientes de

glicina (1-1000 μ M) y 100 μ M de RSV (**Figura 26**). La curva de afinidad mostr3 que resveratrol no cambia la afinidad aparente del receptor por su ligando, obteniendo un EC₅₀ de 49 \pm 4 μ M (**Tabla 4**).

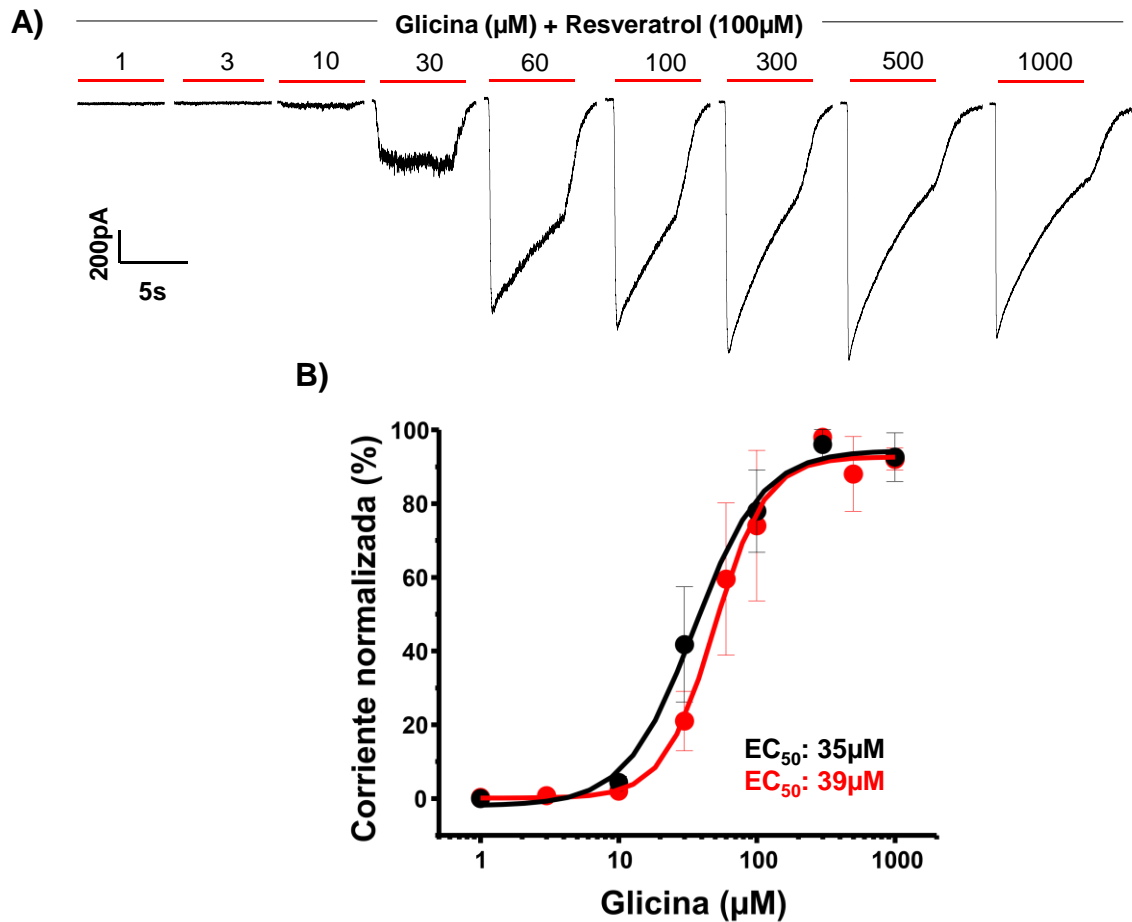


Figura 26: Mecanismo de inhibici3n de la mol3cula de resveratrol en el RGLI α 1. A) Corrientes representativas de la co-aplicaci3n de concentraciones crecientes de glicina (1-1000 μ M) y RSV 100 μ M. B) Gr3fico representativo de las corrientes normalizadas, en ausencia de RSV representado en color negro, presencia de RSV representado en color rojo.

2.5 Evaluación del cambio de la afinidad aparente RGLi $\alpha 2$ por resveratrol.

Con el fin de dilucidar el mecanismo de acción que presenta el fitopolifenol en la inhibición de las corrientes glicinérgicas generadas tras la activación de RGLi, se evaluó el efecto por medio de confección de curvas concentración-respuesta de corrientes evocadas por el receptor de glicina en presencia de resveratrol (100 μ M) y se comparó con las corrientes glicinérgicas en ausencia de RSV.

A partir de la curva concentración-respuesta a resveratrol se obtuvo el IC_{35} para $\alpha 2$ y se evaluó el efecto de resveratrol en el desplazamiento de la curva de concentración-respuesta a glicina co-aplicando concentraciones crecientes de glicina (1-1000 μ M) y 100 μ M de RSV (**Figura 27**). La curva de afinidad mostró que resveratrol no cambia la afinidad aparente significativamente del receptor por su ligando, obteniendo un EC_{50} de $306\pm 53\mu$ M (**Tabla 4**).

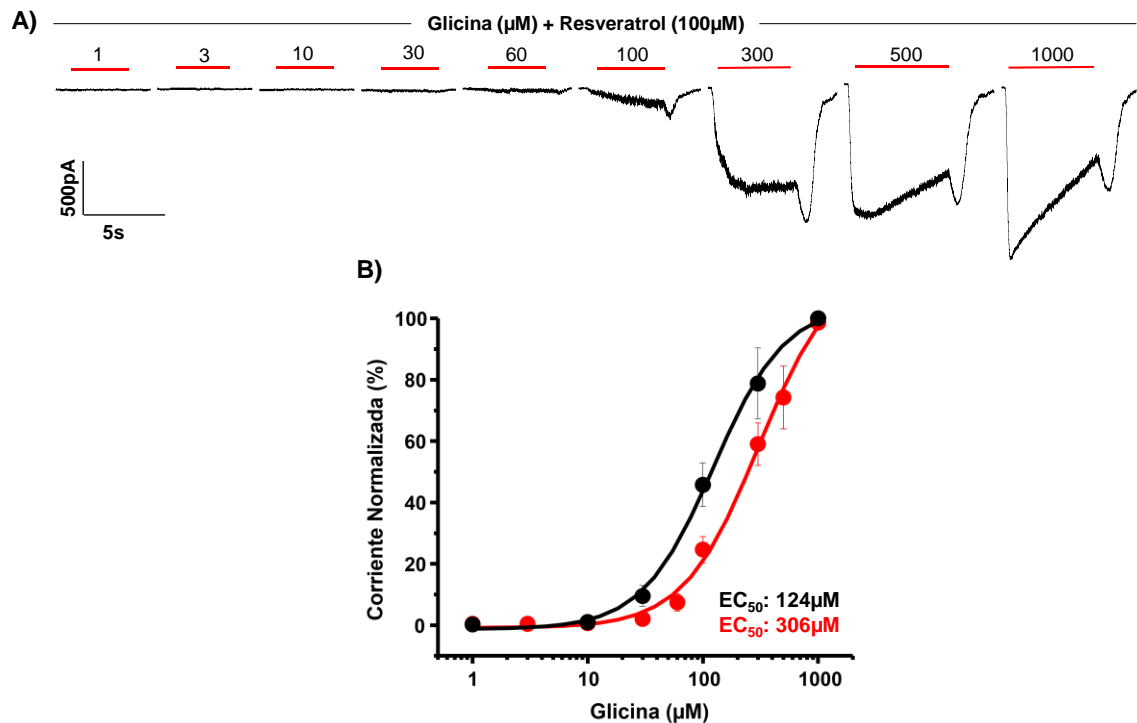


Figura 27: Mecanismo de inhibición de la molécula de resveratrol en el receptor de glicina $\alpha 2$. A) Corriente representativa de la co-aplicación de concentraciones

crecientes de glicina (1-1000 μ M) y RSV 100 μ M. B) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas, en ausencia de RSV representado en color negro, presencia de RSV representado en color rojo.

2.6 Evaluación del cambio de la afinidad aparente RGLi α 3 por resveratrol.

Con el fin de dilucidar el mecanismo de acción que presenta el fitopolifenol en la inhibición de las corrientes glicinérgicas generadas tras la activación de RGLi α 3, se evaluó el efecto por medio de confección de curvas concentración-respuesta de corrientes evocadas por el receptor de glicina en presencia de resveratrol (100 μ M) y se comparó con las corrientes glicinérgicas en ausencia de RSV.

A partir de la curva concentración-respuesta a resveratrol utilizó 100 μ M de resveratrol (IC_{35} para α 3) y se evaluó el efecto de resveratrol en el desplazamiento de la curva de concentración-respuesta a glicina co-aplicando concentraciones crecientes de glicina (1-1000 μ M) y 100 μ M de RSV (**Figura 28**). La curva de afinidad mostró que resveratrol no cambia la afinidad aparente del receptor por su ligando, obteniendo un EC_{50} de $179\pm 4\mu$ M (**Tabla 4**).

De este modo, el análisis electrofisiológico nos permite concluir que Resveratrol es un modulador alostérico negativo del receptor de glicina que presenta una alta potencia. Así mismo, resveratrol no mostró una selectividad significativa por alguna subunidad de los RGLis.

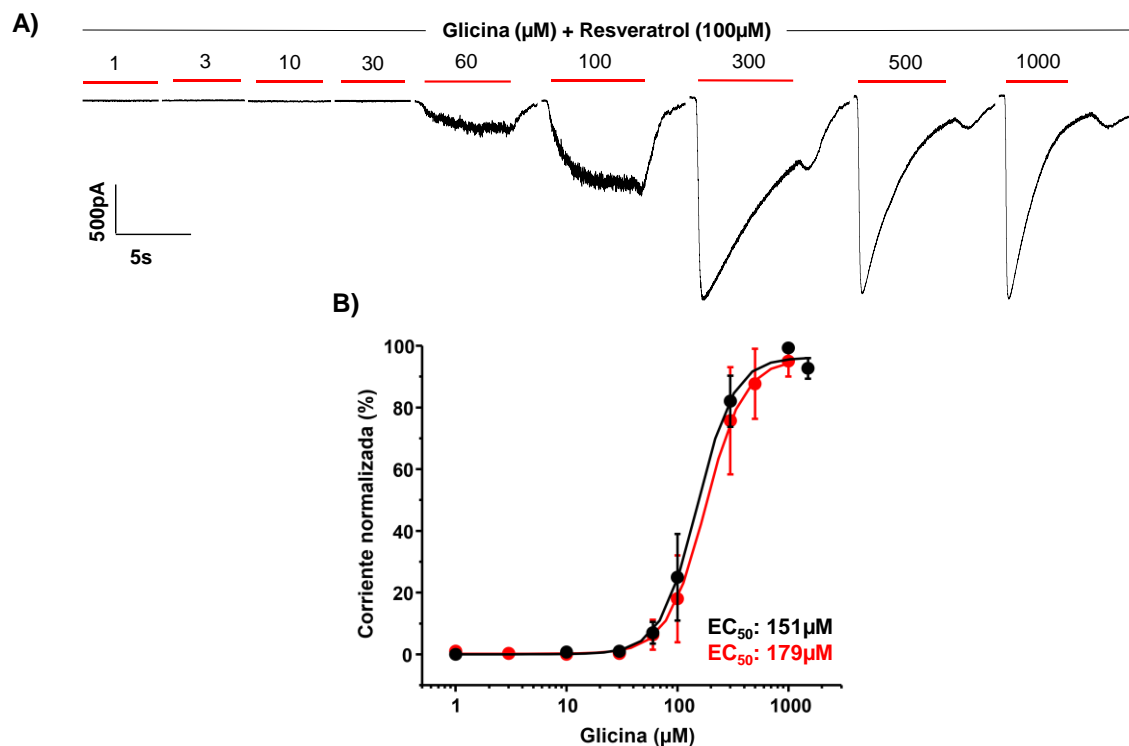


Figura 28: Mecanismo de inhibición de la molécula de resveratrol en el receptor de glicina α_3 . B) Corriente representativa de la co-aplicación de diferentes concentraciones de glicina (1-1000 μM) y RSV 100 μM . C) Gráfico representativo de las corrientes normalizadas, en ausencia de RSV representado en color negro, presencia de RSV representado en color rojo.

Tabla 3 Actividad de RSV sobre diferentes conformaciones de RGli.

RGli	Glicina EC_{50} (μM)	n_H	n	RSV EC_{50} (μM)	n_H	n
α_1	35 \pm 5	1.77 \pm 0.38	3	49 \pm 4	2.34 \pm 0.36	4
α_2	124 \pm 13	1.40 \pm 0.18	4	306 \pm 53	1.33 \pm 0.18	5
α_3	151 \pm 9	2.62 \pm 0.25	4	179 \pm 4	2.50 \pm 0.08	3

2.7 Evaluación de la actividad agonista de Resveratrol en el Receptor de Glicina

Experimentos *in silico* previos indican que posiblemente RSV se uniría cerca del sitio ortostérico del receptor de glicina, lo que podría señalar que la molécula de RSV quizás presenta características agonistas en el receptor. Por este motivo, se investigó si RSV presenta actividad agonista en RGlis homoméricos mediante electrofisiología en RGli $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ funcionalmente expresados en células HEK293. Se realizó registros de célula completa y se observó en las células transfectadas con RGli $\alpha 1$ la ausencia de corriente evocada por diferentes concentraciones de RSV, desde 600-1000 μ M en ausencia de glicina (**Figura 29A**).

Del mismo modo, en el caso de células transfectadas con $\alpha 2$ o con $\alpha 3$ RGli se observó ausencia de corrientes evocadas al aplicar diferentes concentraciones de RSV (**Figura 29 B y C**). En este contexto se puede concluir que resveratrol no presenta un efecto agonista en el receptor de glicina.

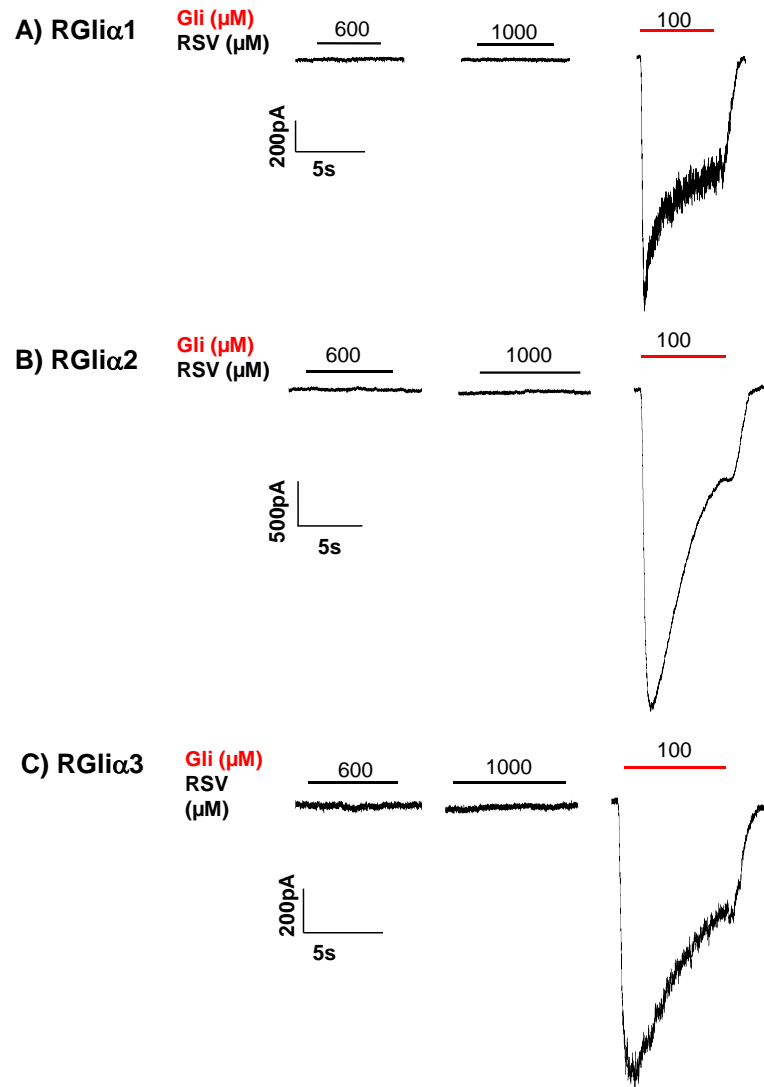


Figura 29: Efecto agonista de resveratrol en RGli recombinante. A) Trazos representativos al aplicar resveratrol (600-800 μ M) en el receptor de glicina y glicina (100 μ M) en (A) RGli α 1, (B) α 2 y (C) α 3.

3. Investigar la relevancia de los residuos putativos de unión determinados por los análisis *in silico* en los efectos de resveratrol en la subunidad $\alpha 1$ del RGI.

Con el fin de identificar el o los aminoácidos importantes para formar el complejo de unión de resveratrol en el receptor de glicina $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, se analizó los sitios de unión resultantes del docking sitio-dirigido. Además, se analizaron los resultados electrofisiológicos obtenidos, concluyendo que se utilizarían las subunidades en conformación cerrada, ya que la molécula de RSV favorece el estado cerrado del receptor de glicina, con lo que iniciamos los análisis *in silico*.

Para esto, se seleccionaron los aminoácidos F91, G152, R57, S150 para mutar en la subunidad $\alpha 1$ del receptor de glicina por Alanina, ya que constituyen una parte importante del bolsillo de unión con Resveratrol. Cabe recalcar que estos aminoácidos no participan directamente con el bolsillo del agonista del receptor. Así mismo, se analizaron los aminoácidos que forman parte del bolsillo de unión en RGI $\alpha 2$ observando que los aminoácidos E164, F51, G167, N53, S164 podrían ser importantes para la unión de resveratrol en el receptor. Y para la subunidad $\alpha 3$ del receptor de glicina se mutaron los aminoácidos E157, F44, N46 por Alanina respectivamente. Observando que no existe un cambio energético (Docking Score y ΔG) significativo en las tres subunidades analizadas con respecto a la secuencia silvestre (**Tabla 5**) y del mismo modo, no se evidencia un cambio significativo de la posición de resveratrol en el receptor de glicina (**Figura 30**). Sin embargo, se puede observar un leve cambio de orientación de la molécula si comparamos los resultados obtenidos en el docking sitio-dirigido con las mutaciones realizadas.

En virtud de los resultados obtenidos se destaca que la mutación de los residuos mencionados en cada homopentámero no son críticos para afectar la unión de Resveratrol a los RGI α s homoméricos.

Tabla 4 Propiedades energéticas de mutación *in silico* RGli α_1 , α_2 y α_3 .

	RGli	ΔG de unión kcal/mol	Docking Score
α_1	WT	-44.83	-6.247
	F91A	-45.36	-5.856
	G152A	-45.30	-6.536
	R57A	-42.51	-6.587
	S150A	-45.41	-6.366
	S150A G152A	-45.91	-6.954
α_2	WT	-48.88	-6.988
	E164A	-42.37	-8.329
	F51A	-43.29	-6.733
	G167A	-35.48	-7.090
	N53A	-42.11	-7.199
	S165A	-32.97	-6.918
α_3	WT	-39.67	-7.176
	E157A	-42.25	-7.129
	F44A	-39.26	-7.330
	N46A	-40.47	-6.556

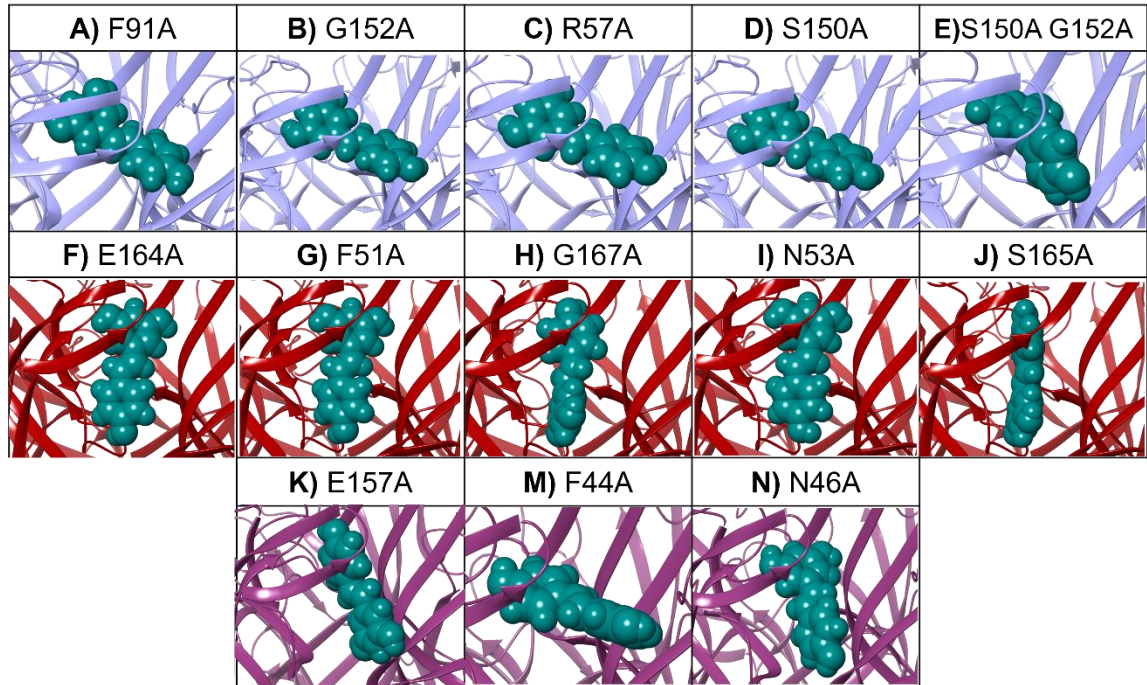


Figura 30: Descripción estructural de la interacción proteína-ligando con sitio de unión mutado (conformación cerrada). (A-E) Interacción RGl α 1-Resveratrol luego de mutar los aminoácidos correspondientes en la descripción de la imagen. (F-J) Interacción RGl α 2-Resveratrol luego de la mutación. (K-N) Interacción RGl α 3-Resveratrol luego de mutar los aminoácidos respectivos.

DISCUSIÓN

La molécula de resveratrol ha ganado una relativa importancia farmacológica debido a sus múltiples efectos descritos en variados sistemas celulares, además de presentar propiedades anticancerígenas, antioxidante, antiinflamatorio y efectos neuro-protectores (46, 53, 82, 83). Dentro de los blancos farmacológicos de resveratrol, se ha informado que los canales iónicos son modulados de forma negativa o positiva dependiendo del canal en cuestión (53, 54).

Dentro de estas proteínas, los canales iónicos pentámeros activados por ligando parecen ser un atractivo blanco farmacológico, se ha descrito que resveratrol es capaz de afectar la función de varios miembros de la familia, incluyendo al receptor de serotonina (53), acetilcolina (52), GABA tipo A (54, 55) y GABA tipo C (56). En el contexto del receptor de glicina, se ha descrito recientemente que resveratrol inhibe las corrientes glicinérgicas en ovocitos de *Xenopus leavis* que expresan RGLi α 1 (48) y también inhibe las IGLi en el colículo inferior y en la corteza auditiva de rata (46) sugiriendo que resveratrol es un modulador no competitivo.

Sin embargo, a la fecha existe escasa información sobre los efectos de resveratrol en las diferentes subunidades y combinaciones del receptor, de igual manera, se desconoce el mecanismo de acción y el sitio de unión que presenta RSV en el receptor de glicina.

- 1. Determinar mediante estudios *in silico* los sitios moleculares putativos de unión de resveratrol en las subunidades α 1, α 2 y α 3 del RGLi.**

En primer lugar, analizamos los posibles sitios de unión de resveratrol a los receptores α 1, α 2 y α 3 en conformación abierta y cerrada del receptor. En

nuestros hallazgos se pudo evidenciar que resveratrol necesita 2 subunidades para acomodarse en el receptor de glicina, uniéndose en la región de intrasubunidad. Esta molécula presenta una tendencia de unión en el ECD del receptor (**Figura 5-10**). Sin embargo, los sitios de unión en el ECD presentan algunas diferencias que son observables en las tres subunidades estudiadas.

Se ha descrito en estudios similares que la molécula AM-3607 presenta su sitio de unión en el anillo superior del RGLi (43) de la misma forma que resveratrol en las isoformas estudiadas en conformación abierta.

En cambio, en conformación cerrada se obtuvo que resveratrol forma diferentes complejos de unión, el primero de ellos y el más favorable energéticamente se sitúa muy cerca del sitio ortostérico en la región ECD entre subunidades; es importante destacar que este complejo de unión coincide en las tres subunidades estudiadas. Si relacionamos esta información con la que se encuentra disponible en investigaciones del receptor con otras moléculas, podemos enlazar estos resultados con estudios similares que han mostrado que el reconocido antagonista “estricnina” se acomoda de forma similar que resveratrol (73). Sin embargo, por lo que hemos estudiado en electrofisiología, resveratrol no actúa como un inhibidor competitivo tal como estriknina. También podemos relacionar esta información con el tropisetron, esta molécula presenta como posible sitio de unión el sitio ortostérico del receptor de glicina (44), el cual se encuentra conservado en las 3 subunidades alfas del receptor, al igual como indican nuestros resultados. El tropisetron actúa como potenciador en concentraciones nanomolares y como un inhibidor a concentraciones micromolares en RGLi α 1 (84). Sin embargo, actúa solo como un inhibidor en RGLi α 2 y α 3 (44).

Interesantemente, el segundo complejo formado por resveratrol se acomoda en el poro del receptor en la región TMD, si comparamos este sitio con moléculas ya estudiadas nos encontramos con picrotóxina, esta se ubica en el receptor de glicina como un bloqueador del poro (2, 85). Sin embargo, el complejo de unión TMD solo se observa en la subunidad alfa 1 del receptor de glicina.

Los datos bioinformáticos indican que todos los posibles sitios de unión presentan propiedades energéticas favorables ligando-receptor (**Tabla 5**), sin embargo, estos podrían presentar diferencias de afinidad por el modulador. Es importante destacar que estos son los primeros resultados *in silico* que muestra posibles sitios de interacción de la molécula de resveratrol en RGlis.

2. Determinar los efectos moduladores de resveratrol sobre la función de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del RGli mediante registros electrofisiológicos.

Los hallazgos de este trabajo lograron profundizar el conocimiento acerca de los efectos de la modulación de resveratrol en los receptores homoméricos conteniendo las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, junto con los receptores heteroméricos conteniendo las subunidades $\alpha 1\beta$, $\alpha 2\beta$. Nuestros resultados en RGlis expresados en células HEK293 muestran que resveratrol modula negativamente la función de RGli, de esta forma nuestros datos están en línea con los resultados experimentales reportados hasta la fecha (46, 48).

Los valores de IC_{50} de las conformaciones estudiadas no son significativamente diferentes, esto se puede extrapolar a que resveratrol presenta un sitio de unión conservado en las subunidades α estudiadas.

A la fecha solo se ha publicado el valor de IC_{50} para la subunidad $\alpha 1$ expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* (48) fue de $54 \pm 2 \mu M$ y el valor de IC_{50} en colículo inferior de rata fue de $58 \pm 8 \mu M$ (46) sin embargo, el IC_{50} obtenido en esta investigación en la subunidad $\alpha 1$ fue de $174 \pm 42 \mu M$. En la presente investigación hemos utilizado un EC_{80} que equivale a $100 \mu M$ de glicina en células HEK293, en cambio en la investigación publicada en el 2014 (48) utilizaron un EC_{25} que equivale a $100 \mu M$ de glicina en ovocitos de *Xenopus laevis*, para construir la curva de inhibición de resveratrol. La discordancia de este valor obtenido se debe

a que la maquinaria de expresión es diferente a las utilizadas en los artículos publicados.

Por otro lado, nuestros resultados muestran por primera vez, que el receptor $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 1\beta$ y $\alpha 2\beta$ expresados en células HEK293, son modulados por resveratrol, donde se obtuvo una IC_{50} de $68\pm 13\mu M$, $98\pm 39\mu M$, $69\pm 16\mu M$ y $67\pm 11\mu M$ correspondientemente, observando que los valores de IC_{50} no son significativamente diferentes (**Tabla 3**). Por otro lado, esta investigación logra expandir estos conocimientos a RGli que incluyen la subunidad $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 1\beta$ y $\alpha 2\beta$ en su estructura. Así, se puede establecer que Resveratrol es un modulador negativo no selectivo del receptor de glicina.

Estudios previos, indican la función antagónica de resveratrol, inhibe las corrientes glicinérgicas de una manera no competitiva (46, 48). En este contexto se realizaron experimentos de desplazamiento de la curva de afinidad que permiten analizar el cambio de la afinidad aparente del receptor por su ligando en presencia de resveratrol en RGli $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$, observando que, resveratrol desplaza la curva de concentración-respuesta hacia la derecha indicando un cambio de afinidad aparente del receptor por su ligando, sin embargo, el desplazamiento no es significativo. En esta misma línea, los valores de EC_{50} obtenidos no son significativamente diferentes a los EC_{50} obtenidos en ausencia de resveratrol, sugiriendo que resveratrol es un modulador no competitivo del receptor de glicina. De este modo, nuestros resultados confirman las observaciones previas realizadas con RGli conformado por la subunidad $\alpha 1$ (48) y receptores de glicina nativos presentes en el colículo inferior de rata (46).

Los resultados verifican que resveratrol no presenta características agonistas, ya que cuando se aplica en primer lugar $600\mu M$ y luego $800\mu M$ de resveratrol no presenta efecto en células HEK293 que expresan $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ del receptor de glicina. Por lo tanto, resveratrol no activa a los RGlis en ausencia del ligando; de esta forma, nuestros resultados están en línea con los datos de estudios anteriores (48).

3. Investigar la relevancia de los residuos putativos de unión determinados por los análisis *in silico* en los efectos de resveratrol en la subunidad $\alpha 1$ del RGI.

Los resultados obtenidos en electrofisiología evidenciaron que resveratrol presenta afinidad por la conformación cerrada del receptor de glicina. Por este motivo se realizaron mutaciones *in silico* en los aminoácidos presentes en el bolsillo de unión a resveratrol en la conformación cerrada del receptor de glicina.

Anteriormente observamos que resveratrol presenta múltiples interacciones importantes en el receptor de glicina, sin embargo, comenzamos con el sitio de unión conservado en las 3 subunidades α estudiadas. Es importante destacar que decidimos no involucrar los aminoácidos que interactúan en el bolsillo de unión a glicina para no alterar la afinidad aparente del receptor por su ligando (5, 86).

En la subunidad $\alpha 1$, se observa de manera *in silico* que resveratrol presenta interacciones claves con F91 que entrega estabilidad al anillo aromático. G152 es un aminoácido clave para el enlace del grupo hidroxilo del resveratrol, ya que forma puentes de hidrogeno entregándole estabilidad a la unión (87). R57 establece unión pi-cación con el anillo aromático que presenta un grupo hidroxilo del resveratrol, esta interacción es fundamental para la función y la farmacología de varios tipos de canales iónicos (88). S150 es clave para la estabilidad de la molécula en el bolsillo de unión a resveratrol.

Para la subunidad $\alpha 2$ se observa de manera *in silico* que resveratrol presenta interacciones claves con E164 y que se encuentra en superficies cercanas a los anillos aromáticos de la molécula, F51 que establece una interacción directa con el anillo aromático de resveratrol, G167 forma enlaces de hidrogeno con moléculas de agua que a su vez están unidas con el grupo hidroxilo de la molécula confiriendo estabilidad proteína-ligando entre dos subunidades (89).

Por otro lado, si se muta N53 podría desestabilizar la interacción de fenilalanina 51 con el anillo aromático de la RSV, lo que podría ser favorable para dilucidar el sitio de unión a RSV y S165 que forma puentes de hidrogeno con el grupo hidroxilo.

Para la subunidad $\alpha 3$ se observa de manera *in silico* que resveratrol presenta interacciones claves con E157 que se encuentra en las cercanías del anillo aromático de resveratrol y no participa en el bolsillo de unión de glicina, F44 se encuentra en las proximidades del anillo aromático, además, al ser un aminoácido de gran tamaño la mutación de este podría causar cambios energéticos considerables y N46 que interacciona directamente con el grupo hidroxilo de RSV formando puentes de hidrógeno importantes para la estabilidad de la molécula.

Posteriormente se realizó una mutación *in silico* de cada uno de los aminoácidos anteriormente mencionados por alanina, para determinar el o los aminoácidos que permiten la unión estable y funcional de resveratrol en el receptor de glicina. Sin embargo, se determinó según propiedades energéticas, que las mutaciones realizadas no fueron suficientes para afectar los probables sitios de unión. Dado que los valores resultantes son más negativos que los valores energéticos silvestres demostrando que resveratrol podría reacomodarse con mayor afinidad en el receptor de glicina si se mutan los aminoácidos anteriormente descritos (**Tabla 5**). Esto también es apreciable en las imágenes (**Figura 30**), ya que a pesar de la mutación *in silico*, resveratrol mantiene la unión al receptor de glicina sin afectar la posición y afectando solo a la orientación de la molécula, provocando que este se acomode de una mejor manera.

Es de suma relevancia identificar los residuos aminoacídicos que permiten la unión estable de RSV en el receptor de glicina, para esclarecer el sitio de unión de RSV ya que aún no ha sido totalmente descrito.

De este modo, es importante destacar que los resultados discutidos anteriormente abren nuevas posibilidades para la investigación de esta molécula

en el receptor de glicina, utilizando nuevas técnicas y/o maquinarias de replicación.

CONCLUSIONES

En resumen, podemos concluir que los resultados de este trabajo de tesis mostraron que Resveratrol es un modulador negativo de RGLi $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ $\alpha 1\beta$ y $\alpha 2\beta$ recombinantes. Los hallazgos obtenidos en experimentos *in silico* sugieren que resveratrol presenta su bolsillo de unión conservado en las subunidades estudiadas en el ECD del receptor de glicina presentando propiedades energéticas favorables para establecer la unión proteína-ligando. Sin embargo, las mutaciones *in silico* realizadas no fueron suficientes para dilucidar el o los aminoácidos importantes para que se establezca esta unión.

Por otro lado, nuestros resultados electrofisiológicos indican que resveratrol es capaz de inhibir de manera concentración dependiente al receptor de glicina $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ $\alpha 1\beta$ y $\alpha 2\beta$, y no es capaz de desplazar hacia la derecha la curva de afinidad aparente de manera significativa en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, sugiriendo que resveratrol es un modulador no competitivo y no selectivo. En adición, se evidenció que resveratrol no presenta propiedades agonistas en el receptor de glicina $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Estudios complementarios contribuirán en esclarecer aún más el mecanismo de acción de resveratrol.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Webb TI, Lynch JW. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des.* 2007;13(23):2350-67.
2. Dutertre S, Becker CM, Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40216-23.
3. Breitingner U, Breitingner HG. Modulators of the Inhibitory Glycine Receptor. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(12):1706-25.
4. Lynch JW, Zhang Y, Talwar S, Estrada-Mondragon A. Glycine Receptor Drug Discovery. *Adv Pharmacol.* 2017;79:225-53.
5. Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, et al. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron.* 2005;45(5):727-39.
6. Yu H, Bai XC, Wang W. Characterization of the subunit composition and structure of adult human glycine receptors. *Neuron.* 2021;109(17):2707-16 e6.
7. Rajendra S, J. Vanderberg R, D.Pierce K, M.Cunningham A, W.French P, H.Barry P, et al. The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element. *The EMBO Journal.* 1995:2987-98.
8. Lynch JW, Rajendra S, Pierce KD, Handford CA, Barry PH, Shofield PR. Identification of intracellular and extracellular domains mediating signal transduction in the inhibitory glycine receptor chloride channel. *The EMBO journal.* 1997:110-20.
9. Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR. The Glycine Receptor. *Pharmacol Ther.* 1997:121-46.
10. Lynch J. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *elsevier.* 2009:303-9.
11. Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H. The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *The EMBO Journal.* 1994:1493.
12. Sola M, Bavro VN, Timmins J, Franz T, Ricard-Blum S, Schoehn G, et al. Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *The EMBO Journal.* 2004:2510-9.
13. Lewis TM, Schofield PR, McClellan AM. Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor. *J Physiol.* 2003;549(Pt 2):361-74.
14. Becker L, Wegerer Jv, Schenkel J, Zeilhofer H-U, Swandulla D, Weiher H. Disease-Specific Human Glycine Receptor alpha1 Subunit Causes Hyperekplexia Phenotype and Impaired Glycine- and GABAAR Receptor Transmission in Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience.* 2002:2505-12.
15. San Martin L, Gallegos S, Araya A, Romero, Romero N, Morelli G, et al. Ethanol consumption and sedation are altered in mice lacking the glycine receptor $\alpha 2$ subunit. *British Journal of Pharmacology.* 2020:3941-56.
16. Yevenes G, Zeilhofer H. Allosteric modulation of glycine receptor. *British Journal of Pharmacology.* 2011:224-36.

17. Molchanova S, Comhair J, Karadurmus D, Piccart E, Harvey R, Rigo J-M, et al. Tonically Active $\alpha 2$ Subunit-Containing Glycine Receptors Regulate the Excitability of Striatal Medium Spiny Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018.
18. Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, et al. Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron*. 1990;4(6):963-70.
19. Grenningloh G, Schmieden V, Schofield PR, Seeburg PH, Siddique T, Mohandas TK, et al. Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *EMBO J*. 1990;9(3):771-6.
20. Vannier C, & Triller, A. Glycine Receptors: Molecular and cell biology. *Encyclopedia of neuroscience*. 2009:921-7.
21. Kumar A, Basak S, Rao S, Gicheru Y, Mayer ML, Sansom MSP, et al. Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in lipid nanodiscs. *Nat Commun*. 2020;11(1):3752.
22. Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG. The activation mechanism of alpha1 homomeric glycine receptors. *J Neurosci*. 2004;24(4):895-906.
23. Burgos CF, Yévenes GE, Aguayo LG. Structure and Pharmacologic Modulation of Inhibitory Glycine Receptors. *Molecular Pharmacology*. 2016:318-25.
24. Yevenes G, Moraga-Cid G, Peoples R, Schmalzing G, Aguayo LG. A selective G $\beta\gamma$ -linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol. *PNAS*. 2008:20523-8.
25. Dong XP, Xu TL. The actions of propofol on gamma-aminobutyric acid-A and glycine receptors in acutely dissociated spinal dorsal horn neurons of the rat. *Anesth Analg*. 2002;95(4):907-14, table of contents.
26. Pistis M, Belelli D, Peters JA, Lambert JJ. The interaction of general anaesthetics with recombinant GABAA and glycine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes: a comparative study. *Br J Pharmacol*. 1997;122(8):1707-19.
27. Lobo IA, Harris RA. Sites of alcohol and volatile anesthetic action on glycine receptors. *Int Rev Neurobiol*. 2005;65:53-87.
28. Franks NPL, W.R. Which molecular targets are most relevant to general anaesthesia? *Toxicology Letters*. 1998;100-101:1-8.
29. Franks NP. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S72-81.
30. Mascia MP, Machu TK, Harris RA. Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics. *Br J Pharmacol*. 1996;119(7):1331-6.
31. Zeller A, Jurd R, Lambert S, Arras M, Drexler B, Grashoff C, et al. Inhibitory ligand-gated ion channels as substrates for general anesthetic actions. *Handb Exp Pharmacol*. 2008(182):31-51.

32. Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(11):519-27.
33. Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(5):370-86.
34. Lu H, Xu TL. The general anesthetic pentobarbital slows desensitization and deactivation of the glycine receptor in the rat spinal dorsal horn neurons. *J Biol Chem.* 2002;277(44):41369-78.
35. Hales TG, Lambert JJ. The actions of propofol on inhibitory amino acid receptors of bovine adrenomedullary chromaffin cells and rodent central neurones. *Br J Pharmacol.* 1991;104(3):619-28.
36. Belelli D, Pistis M, Peters JA, Lambert JJ. General anaesthetic action at transmitter-gated inhibitory amino acid receptors. *PNAS.* 1999:496-502.
37. Lobo IA, Trudell JR, Harris RA. Accessibility to residues in transmembrane segment four of the glycine receptor. *Neuropharmacology.* 2006;50(2):174-81.
38. Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, et al. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature.* 1997;389(6649):385-9.
39. Yevenes GE, Moraga-Cid G, Guzman L, Haeger S, Oliveira L, Olate J, et al. Molecular determinants for G protein betagamma modulation of ionotropic glycine receptors. *J Biol Chem.* 2006;281(51):39300-7.
40. Yevenes GE, Moraga-Cid G, Avila A, Guzman L, Figueroa M, Peoples RW, et al. Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gbetagamma modulation. *J Biol Chem.* 2010;285(39):30203-13.
41. Moraga-Cid G, Yevenes GE, Schmalzing G, Peoples RW, Aguayo LG. A Single phenylalanine residue in the main intracellular loop of alpha1 gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors influences their sensitivity to propofol. *Anesthesiology.* 2011;115(3):464-73.
42. Bregman H, Simard JR, Andrews KL, Ayube S, Chen H, Gunaydin H, et al. The Discovery and Hit-to-Lead Optimization of Tricyclic Sulfonamides as Potent and Efficacious Potentiators of Glycine Receptors. *J Med Chem.* 2017;60(3):1105-25.
43. Huang X, Shaffer PL, Ayube S, Bregman H, Chen H, Lehto SG, et al. Crystal structures of human glycine receptor alpha3 bound to a novel class of analgesic potentiators. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(2):108-13.
44. San Martin VP, Burgos CF, Marileo AM, Lara CO, Sazo A, Fuentealba J, et al. Inhibitory Actions of Tropeines on the alpha3 Glycine Receptor Function. *Front Pharmacol.* 2019;10:331.
45. Lara CO, Murath P, Munoz B, Marileo AM, Martin LS, San Martin VP, et al. Functional modulation of glycine receptors by the alkaloid gelsemine. *Br J Pharmacol.* 2016;173(14):2263-77.
46. Shu FQ, Lu YG, Tang HP, Ye ZY, Huang YN, Wang M, et al. Resveratrol noncompetitively inhibits glycine receptor-mediated currents in neurons of rat central auditory neurons. *Brain Res Bull.* 2021;169:18-24.

47. Y.K G, Briyal S, Chaundhary G. Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced seizures and oxidative stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002:245-9.
48. Lee B-H, Hwang S-H, Choi S-H, Kim H-J, Jung S-W, Kim H-S, et al. Resveratrol Inhibits Glycine Receptor-Mediated Ion Currents. *The Pharmaceutical Society of Japan*. 2014:576-80.
49. Hong I, Tae H, Jin-ho S. Resveratrol inhibits Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*. 2005:134-41.
50. Li-Nan Z, Liang H, Hai-Yan W, Hong-Ning S, Yong-Jun S, Xiao-Yue Y, et al. Neuroprotective Effect of Resveratrol Against Glutamate-Induced Excitotoxicity. *Wroclaw Medical University*. 2015:161-5.
51. Zhao-Bing G, Xuue-Qin C, Guo-Yuan H. Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. *Brain Research*. 2006:41-7.
52. Shinohara Y, Toyohira Y, Ueno S, Liu M, Tsutsui M, Yanagihara N. Effects of resveratrol, a grape polyphenol, on catecholamine secretion and synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(11):1608-18.
53. Lee BH, Hwang SH, Choi SH, Shin TJ, Kang J, Lee SM, et al. Resveratrol enhances 5-hydroxytryptamine type 3A receptor-mediated ion currents: the role of arginine 222 residue in pre-transmembrane domain I. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(4):523-7.
54. Li Z, You Z, Li M, Pang L, Cheng J, Wang L. Protective Effect of Resveratrol on the Brain in a Rat Model of Epilepsy. *Neurosci Bull*. 2017;33(3):273-80.
55. Jang SH, Park SJ, Kim KA, Han SK. Resveratrol activates GABA(A) and/or glycine receptors on substantia gelatinosa neurons of the subnucleus caudalis in mice. *Nat Prod Res*. 2022;36(22):5788-92.
56. Lee BH, Choi SH, Hwang SH, Kim HJ, Lee JH, Nah SY. Resveratrol Inhibits GABAC rho Receptor-Mediated Ion Currents Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2013;17(2):175-80.
57. Turner RS, Thomas RG, Craft S, van Dyck CH, Mintzer J, Reynolds BA, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology*. 2015;85(16):1383-91.
58. Arbo BD, André-Miral C, Nasre-Nasser RG, Schimith LE, Santos MG, Costa-Silva D, et al. Resveratrol Derivatives as Potential Treatments for Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2020;12(103).
59. Wu J, Li Y, Yu J, Gan Z, Wei W, Wang C, et al. Resveratrol Attenuates High-Fat Diet Induced Hepatic Lipid Homeostasis Disorder and Decreases m(6)A RNA Methylation. *Front Pharmacol*. 2020;11:568006.
60. Gambini J, Lopez-Grueso R, Olaso-Gonzalez G, Ingles M, Abdelazid K, El Alami M, et al. [Resveratrol: distribution, properties and perspectives]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2013;48(2):79-88.
61. Zhang LX, Li CX, Kakar MU, Khan MS, Wu PF, Amir RM, et al. Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother*. 2021;143:112164.

62. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(12):1377-82.
63. Meng T, Xiao D, Muhammed A, Deng J, Chen L, He J. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules.* 2021;26(1).
64. Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res.* 2002;958(2):439-47.
65. Katila N, Duwa R, Bhurtel S, Khanal S, Maharjan S, Jeong JH, et al. Enhancement of blood-brain barrier penetration and the neuroprotective effect of resveratrol. *J Control Release.* 2022;346:1-19.
66. Sawda C, Moussa C, Turner RS. Resveratrol for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1403(1):142-9.
67. Virgili M, Contestabile A. Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neurosci Lett.* 2000;281(2-3):123-6.
68. Bastianetto S, Menard C, Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(6):1195-201.
69. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem.* 2003;36(1):79-87.
70. Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Clinical trials of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1215:161-9.
71. Tome-Carneiro J, Gonzalez M, Larrosa M, Yanez-Gascon MJ, Garcia-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, et al. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2012;110(3):356-63.
72. Yu J, Zhu H, Lape R, Greiner T, Du J, Lu W, et al. Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor. *Cell.* 2021;184(4):957-68 e21.
73. Du J, Lu W, Wu S, Cheng Y, Gouaux E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature.* 2015;526(7572):224-9.
74. Huang X, Chen H, Michelsen K, Schneider S, Shaffer PL. Crystal structure of human glycine receptor-alpha3 bound to antagonist strychnine. *Nature.* 2015;526(7572):277-80.
75. Caruso F, Tanski J, Villegas-Estrada A, Rossi M. Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure. *J Agric Food Chem.* 2004;52(24):7279-85.
76. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem.* 2004;47(7):1739-49.
77. Yunta MJR. Some Critical Aspects of Molecular Interactions Between Drugs and Receptors. *American Journal of Modeling and Optimization.* 2014;2:84-102.

78. Munoz-Montesino C, Burgos CF, Lara CO, Riquelme CR, Flaig D, San Martin VP, et al. Inhibition of the Glycine Receptor alpha 3 Function by Colchicine. *Front Pharmacol.* 2020;11:1143.
79. San Martin LS, Armijo-Weingart L, Araya A, Yevenes GE, Harvey RJ, Aguayo LG. Contribution of GlyR alpha3 Subunits to the Sensitivity and Effect of Ethanol in the Nucleus Accumbens. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:756607.
80. Maleeva G, Peiretti F, Zhorov BS, Bregestovski P. Voltage-Dependent Inhibition of Glycine Receptor Channels by Niflumic Acid. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:125.
81. Shan Q, Haddrill JL, Lynch JW. A single beta subunit M2 domain residue controls the picrotoxin sensitivity of alphabeta heteromeric glycine receptor chloride channels. *J Neurochem.* 2001;76(4):1109-20.
82. Hecker A, Schellnegger M, Hofmann E, Luze H, Nischwitz SP, Kamolz LP, et al. The impact of resveratrol on skin wound healing, scarring, and aging. *Int Wound J.* 2022;19(1):9-28.
83. Galiniak S, Aebischer D, Bartusik-Aebischer D. Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim Pol.* 2019;66(1):13-21.
84. Yang Z, Ney A, Cromer BA, Ng HL, Parker MW, Lynch JW. Tropisetron modulation of the glycine receptor: femtomolar potentiation and a molecular determinant of inhibition. *J Neurochem.* 2007;100(3):758-69.
85. Wang DS, Mangin JM, Moonen G, Rigo JM, Legendre P. Mechanisms for picrotoxin block of alpha2 homomeric glycine receptors. *J Biol Chem.* 2006;281(7):3841-55.
86. Vandenberg RJ, Handford CA, Schofield PR. Distinct agonist- and antagonist-binding sites on the glycine receptor. *Neuron.* 1992;9(3):491-6.
87. Roderick E Hubbard MKH. *Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength.* 2010.
88. Infield DT, Rasouli A, Galles GD, Chipot C, Tajkhorshid E, Ahern CA. Cation-pi Interactions and their Functional Roles in Membrane Proteins. *J Mol Biol.* 2021;433(17):167035.
89. Klabunde T, Petrassi HM, Oza VB, Raman P, Kelly JW, Sacchettini JC. Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors. *Nat Struct Biol.* 2000;7(4):312-21.