



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

TITULO:

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES Y BIOQUÍMICAS  
DE LOS RESIDUOS KK385-386 DEL RECEPTOR DE GLICINA  $\alpha$ 1 EN LA  
MODULACIÓN POR ETANOL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE  
RATONES TRANSGÉNICOS**

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

**Braulio Alfredo Muñoz Ramírez**

**CONCEPCIÓN-CHILE**

**2016**

Profesor Guía: Luis Gerardo Aguayo Hernández  
Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Luis G. Aguayo  
Profesor Guía  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Francisco Nualart Santander  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Bernardo Morales Muñoz  
Facultad de Química y Biología  
Universidad de Santiago

---

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. José Guzmán González  
Director (s)  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
LISTA DE ABREVIACIONES .....	10
RESUMEN.....	14
ABSTRACT .....	16
INTRODUCCIÓN.....	18
1.- Receptor de glicina. ....	20
<b>2.- MODULACIÓN DE R-GLI POR ETANOL. ....</b>	<b>22</b>
2.1- Efectos de etanol en la transmisión glicinérgica fásica.....	22
2.2- Efectos de etanol en la transmisión glicinérgica tónica. ....	25
<b>3.- LOS EFECTOS DE ETANOL EN R-GLI <math>\alpha</math>1 PUEDEN SER EXPLICADOS POR DOS MECANISMOS.....</b>	<b>27</b>
3.1- Modulación directa de etanol en R-Gli $\alpha$ 1 mediante bolsillo de unión y dominio extracelular.....	28
3.2- Modulación indirecta de R-Gli $\alpha$ 1 a través de heterodímero G $\beta\gamma$ de la proteína G.....	30
<b>4.- RECEPTOR DE GLICINA EN DIVERSAS REGIONES DEL SNC. ....</b>	<b>33</b>
4.1- Sistema de recompensa del cerebro.....	34
4.2- Sistema mesolímbico dopaminérgico en relación a etanol.....	35
4.3- Sistema mesolímbico dopaminérgico y R-Gli. ....	38
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>45</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
<b>OBJETIVO GENERAL: CARACTERIZAR LAS PROPIEDADES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS RESIDUOS KK385-386 DEL RECEPTOR DE GLICINA SUBUNIDAD <math>\alpha</math>1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....</b>	<b>46</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 1: CARACTERIZAR LA PRESENCIA DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS EN DISTINTAS REGIONES DEL SNC DE RATONES WT Y KI.....</b>	<b>46</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 2: CARACTERIZAR LA PRESENCIA DE R-GLI EN nAc Y DETERMINAR LAS PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DEL R-GLI <math>\alpha</math>1 EN NEURONAS DISOCIADAS Y EN REBANADAS DE TEJIDO DEL nAc, PFC Y VTA DE RATONES WT, KI Y D1-GFP.....</b>	<b>46</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 3: CARACTERIZAR EL ROL DE R-GLI <math>\alpha</math>1 EN LOS EFECTOS SEDATIVOS, DE CONSUMO Y PREFERENCIA A ETANOL EN RATONES WT Y KI..</b>	<b>47</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>RATONES .....</b>	<b>48</b>
<i>Ratón <math>\alpha</math>1KK385-386AA KI.....</i>	<i>48</i>

<i>Ratón D1-GFP</i> .....	49
<b>CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS ESPINALES</b> .....	<b>49</b>
<b>PREPARACIÓN DE LAS REBANADAS DE CEREBRO DE RATÓN</b> .....	<b>50</b>
<b>DISOCIACIÓN ENZIMÁTICA DE NEURONAS</b> .....	<b>50</b>
<b>WESTERN BLOT</b> .....	<b>51</b>
<i>Western blot de tejidos</i> .....	51
<i>Western Blot desde cultivos de neuronas espinales</i> .....	52
<b>DOT BLOT</b> .....	<b>53</b>
<b>INMUNOCITOQUÍMICA</b> .....	<b>53</b>
<i>Cultivo de neuronas espinales de ratón</i> .....	53
<i>Rebanadas coronales de cerebro</i> .....	54
<i>Neuronas disociadas de nucleus accumbens</i> .....	55
<b>PCR CONVENCIONAL</b> .....	<b>56</b>
<b>ELECTROFISIOLOGÍA</b> .....	<b>57</b>
<i>Corrientes macroscópicas evocadas de glicina:</i> .....	57
<i>Corrientes de canal único evocadas por glicina</i> .....	58
<i>Corrientes sinápticas inhibitorias en miniaturas de glicina (mIPSCs)</i> .....	59
<i>Corrientes sinápticas eléctricamente evocadas de glicina (eIPSCs)</i> .....	60
<i>Corrientes tónicas asociadas a R-Gli</i> .....	61
<i>Registros de corriente fija (Iclamp)</i> .....	61
<b>ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO</b> .....	<b>62</b>
<i>LORR. Loss of Righting Reflex</i> .....	62
<i>Prueba de consumo libre y voluntario de etanol; Drinking in the dark (DID)</i> .....	63
<i>Metabolismo de alcohol</i> .....	63
<i>Prueba de preferencia, Conditioned Place Preference (CPP)</i> .....	64
<b>SOLUCIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE DATOS</b> .....	<b>65</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>66</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 1: CARACTERIZAR LA PRESENCIA DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS EN DISTINTAS REGIONES DEL SNC DE RATONES WT Y KI</b> .....	<b>66</b>
<i>1.1 Niveles de proteínas sinápticas en tejidos neuronales de ratones WT y KI</i> .....	67
<i>1.1.1 Médula espinal</i> .....	67
<i>1.1.2 Tronco encefálico</i> .....	68
<i>1.1.3 Hipocampo</i> .....	68
<i>1.1.4 Cerebelo</i> .....	68

1.1.5 Subunidades $\alpha 1$ y $\beta$ del receptor de glicina en regiones del SNC en ratones WT y KI .....	74
1.2 Niveles relativos de proteínas sinápticas en cultivo de neuronas espinales de 15 DIV en ratones WT y KI .....	77
1.3 Agrupaciones de R-Gli $\alpha 1$ en cultivos de neuronas espinales de 15 DIV en ratones WT y KI.....	79
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 2: CARACTERIZAR LA PRESENCIA DE R-GLI EN nAc Y DETERMINAR LAS PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DEL R-GLI <math>\alpha 1</math> EN NEURONAS DISOCIADAS Y EN REBANADAS DE TEJIDO DEL nAc, PFC Y VTA DE RATONES WT, KI Y D1-GFP.....</b>	<b>83</b>
<b>2.1 NIVELES DE mRNA Y PROTEÍNAS GLICINÉRGICAS (R-GLI Y GlyT) EN NUCLEUS ACCUMBENS. ....</b>	<b>84</b>
2.1.1 Niveles de mRNA para proteínas glicinérgicas en nucleus accumbens.....	84
2.1.2 Niveles de proteínas glicinérgicas en nucleus accumbens de ratón WT y KI.....	86
2.1.3 Localización de R-Gli $\alpha 1$ en neuronas de nucleus accumbens.....	88
<b>2.2 SENSIBILIDAD A GLICINA EN NEURONAS DISOCIADAS DE nAc, VTA Y PFC ...</b>	<b>90</b>
2.2.1 Nucleus accumbens (nAc).....	90
2.2.2 Área Tegmental Ventral (VTA) y Corteza prefrontal (PFC).....	91
<b>2.3 EFECTOS DE ETANOL EN NEURONAS DISOCIADAS DE nAc, VTA Y PFC.....</b>	<b>94</b>
2.3.1 Nucleus accumbens (nAc).....	94
2.3.2 Área Tegmental Ventral (VTA) y Corteza prefrontal (PFC).....	95
<b>2.4 EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNA G EN NEURONAS DISOCIADAS DE nAc, VTA Y PFC .....</b>	<b>99</b>
2.4.1 Nucleus accumbens (nAc).....	99
2.4.2 Área Tegmental Ventral (VTA) y Corteza prefrontal (PFC).....	100
<b>2.5 COMPARACIÓN DE SENSIBILIDAD A GLICINA Y ETANOL EN MEDIUM SPINY NEURONS DE RATONES D1-GFP EN NUCLEUS ACCUMBENS.....</b>	<b>103</b>
2.5.1 Sensibilidad a glicina .....	104
2.5.2 Sensibilidad a etanol.....	107
2.5.3 Comparación de respuestas de glicina y etanol en nAc, VTA y PFC .....	112
<b>2.6 CORRIENTES SINÁPTICAS DE GLICINA EN REBANADAS DE nAc DE WT, KI Y D1-GFP. ....</b>	<b>114</b>
<b>2.7 EFECTOS DE ETANOL EN IPSCS GLICINÉRGICOS EN REBANADAS DE nAc DE WT, KI Y D1-GFP. ....</b>	<b>118</b>
<b>2.8 EVALUACIÓN DE CORRIENTES TÓNICAS EN NÚCLEO ACCUMBENS DE WT, KI Y D1-GFP.....</b>	<b>124</b>

<b>2.9 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN Y POTENCIACIÓN DE R-GLI EN LA EXCITABILIDAD NEURONAL DE NEURONAS ACCUMBALES DE RATONES WT, KI Y D1-GFP .....</b>	<b>129</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO 3: CARACTERIZAR EL ROL DE R-GLI <math>\alpha</math>1 EN LOS EFECTOS SEDATIVOS, DE CONSUMO Y PREFERENCIA A ETANOL EN RATONES WT Y KI.</b>	<b>134</b>
<i>3.1 Efectos sedativos de etanol en ratones WT y KI. ....</i>	<i>134</i>
<i>3.2 Determinación de consumo libre a etanol en ratones WT y KI.....</i>	<i>136</i>
<i>3.3 Determinación de preferencia condicionada a etanol en ratones WT y KI.....</i>	<i>138</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>142</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>155</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>158</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>160</b>



## Índice Figuras

Figura 1. Esquema del circuito de recompensa VTA-nAc.....	37
Figura 2. Esquema de trabajo. Caracterizar la presencia de proteínas pre y post sinápticas en distintas regiones del SNC de ratones WT y KI.....	42
Figura 3. Esquema de trabajo. Caracterizar la presencia de R-Gli en nAc y determinar las propiedades electrofisiológicas del R-Gli $\alpha 1$ en neuronas disociadas y en rebanadas de tejido del nAc, PFC y VTA de ratones WT, KI y D1-GFP.....	43
Figura 4. Proteínas sinápticas en médula espinal.....	70
Figura 5. Proteínas sinápticas en tronco encefálico.....	71
Figura 6. Proteínas sinápticas en hipocampo.....	72
Figura 7. Proteínas sinápticas en cerebelo.....	73
Figura 8. Subunidades $\alpha 1$ y $\beta$ del receptor de glicina.....	75
Figura 9. Proteínas sinápticas en neuronas espinales en cultivo de 15 DIV.....	78
Figura 10. Presencia de R-Gli $\alpha 1$ en cultivo de neuronas espinales de 15 DIV.....	81
Figura 11. Expresión de mRNA para las subunidades de R-Gli y GlyT2 en nucleus accumbens en cerebro de ratón.....	85
Figura 12. Proteínas glicinérgicas en nucleus accumbens de ratón WT y KI.....	87
Figura 13. Localización neuronal de R-Gli $\alpha 1$ en neuronas de nucleus accumbens.....	89
Figura 14. Neuronas disociadas de nucleus accumbens son sensibles a glicina.....	92
Figura 15. Neuronas disociadas desde VTA y PFC son sensibles a glicina.....	93
Figura 16. Efectos de etanol en neuronas de nAc WT y KI.....	96
Figura 17. Efectos de 10 mM de etanol en corrientes unitarias de glicina en neuronas de nAc WT y KI.....	97
Figura 18. Efectos de etanol en neuronas de VTA y PFC.....	98
Figura 19. Efectos de la activación de proteína G por GTP- $\gamma$ -S en neuronas de nAc WT y KI.....	101
Figura 20. Efectos de la activación de proteína G por GTP- $\gamma$ -S en neuronas de VTA y PFC.....	102
Figura 21. Imágenes de rebanadas corónales de ratón D1-GFP.....	105
Figura 22. MSNs D1 disociadas de nucleus accumbens son más sensibles a glicina.....	106
Figura 23. Efectos de etanol en MSNs de nAc.....	109
Figura 24. Efectos de 10 mM de etanol y dopamina en MSNs D1+.....	110
Figura 25. Efecto de 10 mM de etanol en corrientes unitarias de glicina en MSNs D1+.....	111
Figura 26. Presencia de transmisión glicinérgica en MSNs D1+ de nAc.....	116
Figura 27. Presencia de mIPSCs en neuronas de nAc WT y KI.....	117
Figura 28. Efectos de etanol en mIPSCs de nAc WT y KI.....	119
Figura 29. Efectos de etanol en mIPSCs de MSNs D1 de nAc.....	120
Figura 30. Efectos de etanol en corrientes glicinérgicas eléctricamente evocadas en nAc WT y KI.....	122

Figura 31. Efectos de etanol en corrientes glicinérgicas eléctricamente evocadas en MSNs D1. ....	123
Figura 32. Presencia de corrientes de glicina tónicas sensibles a estriquina y etanol en MSNs D1+. ....	126
Figura 33. Presencia de corrientes tónicas de glicina en MSNs WT y KI de nAc. ....	127
Figura 34. Etanol aumenta corriente tónica de glicina en MSNs WT de nAc. ....	128
Figura 35. Efectos de la inhibición y potenciación de R-Gli en la excitabilidad de MSNs D1+ en nAc. ....	131
Figura 36. Efectos de la inhibición y potenciación de R-Gli en la excitabilidad de la red neuronal en nAc de WT y KI. ....	132
Figura 37. Efectos sedativos de etanol en animales WT y KI de 3era y 7ma generación. ....	137
Figura 38. Consumo libre a etanol en animales WT y KI. ....	140
Figura 39. Preferencia condicionada a etanol en ratones WT y KI. ....	141
Figura 40. Etanol modula a R-Gli $\alpha 1$ en MSNs D1 de nAc. ....	157





## Índice de Tablas

TABLA 1. Resumen propiedades electrofisiológicas de los Receptores de glicina expresados en células HEK293.....	44
TABLA 2. Resumen de niveles relativos de proteínas sinápticas en diferentes tejidos neuronales de ratones WT y KI.....	76
TABLA 3. Resumen de niveles relativos de proteínas sinápticas en cultivo de neuronas espinales de ratón WT y KI.....	77
TABLA 4. Resumen de efectos de glicina y etanol en neuronas de nAc, VTA y PFC.....	113



## Lista de abreviaciones

**4-AP**, 4-aminopiridina

**ACh**, Acetilcolina

**aCSF**, Fluido Cerebro Espinal Artificial

**AMPA**, Ácido  $\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-Metil-4-isoxazol-Propionico

**AP**, Potencial de acción

**BAC**, Cromosoma bacterial artificial

**BEC**, Concentración de etanol en la sangre (Blood ethanol concentration)

**bp**, pares de bases

**Br-**, Bromuro

**BS**, Troco encefálico

**BSA**, Albumina de suero bovino

**BT**, Biotinilado

**BZ**, Benzodiazepinas

**CBL**, Cerebelo

**Cl-**, Cloruro

**CNQX**, 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona

**CPP**, Preferencia condicionada a un sitio (Conditioned Place Preference)

**D1**, Receptor de Dopamina de tipo 1

**D1-GFP**, Ratón transgénico con GFP en D1

**D2**, Receptor de Dopamina de tipo 2

**DA**, Dopamina

**D-APV**, Ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico

**DAR**, Receptor de Dopamina

**DEC**, Domino extracelular

**DID**, Consumo en la oscuridad (Drinking in the dark)

**DIV**, Días in vitro

**DMSO**, Dimetil sulfóxido

**EC50**, Concentración equivalente al 50% de la respuesta

**eIPSCs**, Corrientes Post Sinápticas Inhibitorias evocadas

**EtOH**, Etanol

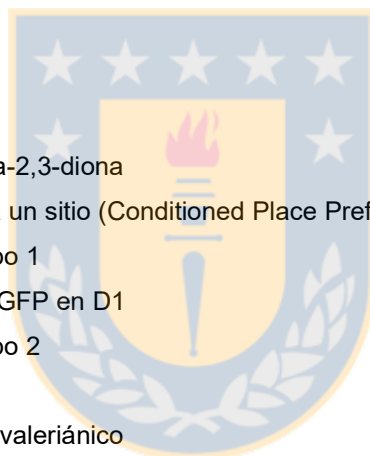
**g/kg**, gramos por kilogramo

**GABA**, ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GAD 67**, Glutamato decarboxilasa 67

**GDI**, Inhibidor de la disociación de guanina

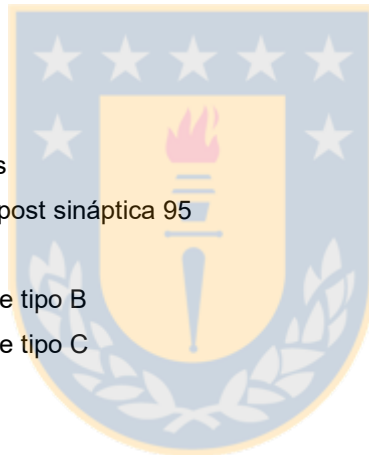
**GDP**, Guanosina-difosfato



**GDP- $\beta$ -S**, Guanosina 5'-( $\beta$ -tio) difosfato  
**GEF**, Factor intercambiador de guanina  
**GFP**, Proteína fluorescente Verde  
**GIRK**, Canal rectificador hacia adentro de potasio  
**GluR1**, Subunidad 1 de R-AMPA  
**GlyT1**, Transportador de glicina de tipo 1  
**GlyT2**, Transportador de glicina de tipo 2  
**GPCR**, Receptor acoplado a proteína G  
**GST**, Glutación S-transferasa  
**GTP**, Guanosina-trifosfato  
**GTP- $\gamma$ -S**, Guanosina 5'-O-( $\gamma$ -tio) trifosfato  
**G $\alpha$** , Subunidad  $\alpha$  de la proteína G heteromérica  
**G $\beta\gamma$** , Subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G heteromérica  
**H**, Hipocampo  
**h**, hora (s)  
**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>**, Bicarbonato  
**HEPES**, Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etano-sulfónico  
**HRP**, Enzima peroxidasa de rábano  
**Hz**, Hertz  
**HZ**, Heterocigoto  
**I**, Yoduro  
**i.p.**, Intraperitoneal  
**IEI**, Intervalo Inter-eventos  
**IPSCs**, Corrientes Post Sinápticas Inhibitorias  
**KI**, Knock In  
**KO**, Knock Out  
**LGIC**, Canales Iónicos Activados por Ligando  
**LI**, Loop Intracelular  
**LORR**, Loss of Righting Reflex  
**MAP2**, Proteína asociada a microtúbulos 2  
**MEM**, Minimal Esencial Medium  
**mIPSCs**, Corrientes Post Sinápticas Inhibitorias miniaturas  
**mM**, mili Molar  
**mm**, milímetro  
**mOsm**, mili Osmol  
**ms**, mili segundo  
**MSNs**, Medium Spiny Neurons



**mV**, mili voltio  
**MΩ**, Mega Ohm  
**nAc**, Nucleus Accumbens  
**NIAAA**, Instituto Nacional en Abuso de Alcohol y Alcoholismo  
**NIH**, Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos  
**nM**, nano Molar  
**NMDA**, N-Metil-D-Aspartato  
**nPo**, Probabilidad de apertura total del canal  
**OFC**, Corteza Orbito frontal  
**pA**, Pico Amperes  
**PBS**, Tampón Fosfato Salino  
**PCR**, Reacción de polimerasa en cadena  
**pF**, Pico Faradio  
**PFC**, Corteza Prefrontal  
**PKC**, Proteína quinasa C  
**PRO**, Propofol  
**pS**, Pico Siemens  
**PSCs**, Corrientes Post Sinápticas  
**PSD95**, Proteína de la densidad post sináptica 95  
**PTX**, Picrotoxina  
**R-GABA<sub>B</sub>**, Receptor de GABA de tipo B  
**R-GABA<sub>C</sub>**, Receptor de GABA de tipo C  
**R-5HT<sub>3</sub>**, Receptor de Serotonina  
**R-AMPA**, Receptor de AMPA  
**R-GABA<sub>A</sub>**, Receptor de GABA de tipo A  
**R-Gli α1**, Subunidad α1 del Receptor de Glicina  
**R-Gli**, Receptor de Glicina  
**R-mACh**, Receptor muscarínico de Acetilcolina  
**R-nACh**, Receptor Nicotínico de Acetilcolina  
**R-NMDA**, Receptor de NMDA  
**RU**, Unidades relativas  
**s**, segundos  
**s/min**, Segundos en un minuto  
**SC**, Médula espinal  
**SDS**, Dodecil-sulfato de sodio  
**SEM**, Error estándar de la media  
**sIPSCs**, Corrientes Post Sinápticas Inhibitorias espontaneas



**SNC**, Sistema Nervioso Central

**STN**, Estricnina

**Syn1**, Sinapsina 1

**TM**, Transmembrana

**TTX**, Tetrodotoxina

**vGAT**, Transportador vesicular de GABA

**vGluT1**, Transportador vesicular de Glutamato 1

**VIAAT**, Transportador de Aminoácido Inhibitorio Vesicular

**VTA**, Área Tegmental Ventral

**WT**, Wild Type

**Zn<sup>2+</sup>**, Zinc

**μA**, micro ampere

**μM**, Micro Molar

**μm**, micrómetro

**τ**, Constante de decaimiento (tau)



## Resumen

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la corriente de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) activada por glicina puede ser potenciada por concentraciones bajas y clínicamente relevantes de etanol. Además, se ha demostrado la modulación intracelular mediada por el dímero  $\text{G}\beta\gamma$  de la proteína G sobre el Receptor de Glicina (R-Gli)  $\alpha 1$ , mediante la interacción con los aminoácidos básicos (316-320 y 385/386) localizados en el loop intracelular TM3-TM4. R-Gli  $\alpha 1$  mutado en los residuos 316-320 y 385-386, son resistentes a la modulación del dímero  $\text{G}\beta\gamma$  y también insensibles a los efectos de etanol. Además, datos recientes han demostrado que R-Gli sería importante en el sistema de recompensa del cerebro (Área Tegmental Ventral; VTA, Corteza prefrontal; PFC y núcleo accumbens; nAc). Es por ello, que se ha generado un ratón Knock-In (KI) para R-Gli  $\alpha 1$ , el cual posee mutaciones KK385-386AA, generándose un animal KI KK385/386AA.

En esta tesis, evaluamos las propiedades de los receptores expresados *in situ* en neuronas de animales WT y KI de regiones involucradas con el sistema mesolímbico dopaminérgico (nAc, PFC y VTA). Primero, caracterizamos bioquímicamente (PCR, western blot e inmunocitoquímica) la presencia de mRNA y proteínas pre y post sinápticas importantes para el balance excitatorio-inhibitorio. Encontramos, que no existen grandes diferencias en la expresión de proteínas en regiones del sistema nervioso central (SNC) de WT y KI, sólo se muestra un incremento en las proteínas pre sinápticas GAD67 y vGLUT en el cerebelo del ratón KI, que están relacionadas con la síntesis de GABA y transporte de

glutamato, respectivamente. Luego, a través de estudios electrofisiológicos en neuronas disociadas de nAc, evaluamos y comparamos funcionalmente la modulación por etanol entre neuronas de ratones WT y KI en nAc. Encontramos que las neuronas accumbales KI son menos sensibles a los efectos de etanol mediados por  $G\beta\gamma$ . Además, utilizando el animal D1-GFP, comparamos la sensibilidad a etanol entre Medium Spiny Neurons (MSNs) D1+ y D1-, encontrando que las MSNs D1+, son sensibles a bajas concentraciones de etanol (1, 5 y 10 mM), mientras que las D1-, son sensibles a altas concentraciones (50, 100 mM). Posteriormente, utilizando rebanadas de nAc, determinamos la presencia de R-Gli no-sinápticos y sinápticos que median corrientes tónicas y fásicas, respectivamente. Encontramos, que MSNs poseen corrientes tónicas y fásicas, siendo sólo las primeras sensibles a bajas concentraciones de etanol, mientras que las segundas son insensibles. Sugiriendo que R-Gli no-sinápticos sensibles a etanol, estarían participando en el balance excitatorio-inhibitorio del nAc, debido a que etanol disminuyen los potenciales de acción (AP) sólo en MSNs WT, siendo este efecto bloqueado por estriquina (STN). Finalmente, con estudios de comportamiento, encontramos que ratones KI fueron similares a WT en condiciones controles, pero cuando se desarrolló la prueba de Perdida del reflejo de enderezarse (LORR), ratones KI mostraron un menor tiempo de sedación a concentraciones altas de etanol (3.5 g/kg). Además, animales KI mostraron mayor consumo y preferencia a etanol. En conclusión, esta tesis nos ayuda a entender el rol de R-Gli  $\alpha 1$  en el sistema de recompensa, con el fin de analizar la acción fisiológica de etanol en el desarrollo patológico del abuso alcohólico y alcoholismo.

## Abstract

Previous studies in our laboratory have demonstrated that chloride current activated by glycine can be potentiated by low and clinically relevant concentration of ethanol. Furthermore, has been show intracellular modulation mediated by  $G\beta\gamma$  subunit from G protein on  $\alpha 1$  GlyR, this modulation is mediated by the interaction of  $G\beta\gamma$  with basic aminoacids (316-320 and 385/386) localized in intracellular loop between TM3 and TM4. Interestingly, our previous results have demonstrated that mutated  $\alpha 1$  GlyR in 316-320 and 385-386, are resistant to  $G\beta\gamma$ -mediated modulation and also insensitive to ethanol effects. Furthermore, recent data has been show that GlyR is important in brain reward system (Ventral tegmental area; VTA, Prefrontal Cortex; PFC and nucleus accumbens; nAc). It is therefore, we generated an  $\alpha 1$  GlyR Knock-In mice (KI), which have the mutation in lysine 385 and 386, was substituted by alanine's, generating a KK385/386AA animal.

In this thesis, we evaluated the receptor properties expressed *in situ* in neurons from WT and KI animals of regions involved with mesolimbic dopaminergic system. First, we characterize biochemically (PCR, western blot and immunocytochemistry) the presence of mRNA and pre and post-synaptic protein important for excitatory-inhibitory balance. We found, that there are no differences in protein expression in different central nervous system regions of WT and KI, shows only an increase in the GAD67 and VGLUT pre synaptic protein in the cerebellum from KI mouse, which are related to GABA synthesis and transport of glutamate, respectively. Then, through electrophysiological studies in dissociated neurons from nAc, we



evaluate and compare functionally ethanol modulation between neurons from WT and KI mice in nAc. We found that KI accumbals neurons are less sensitive to the effects of ethanol mediated by  $G\beta\gamma$ . Furthermore, using the animal D1-GFP, we compared the sensitivity to ethanol between Medium Spiny Neurons (MSNs) D1+ and D1-, finding that MSNs D1+, are sensitive to low concentrations of ethanol (1, 5 and 10 mM) while D1-, are sensitive at high concentrations (50, 100 mM). Subsequently, using nAc slices we determine the presence of synaptic and non-synaptic GlyR, which mediate tonic and phasic currents, respectively. We found that MSNs have tonic and phasic current, being ethanol sensitive at low concentrations only the first, while the second are insensitive. Suggesting that non-synaptic GlyR sensitive to ethanol would involve in the excitatory-inhibitory balance in nAc, because ethanol decrease the actions potentials (AP) only in MSNs WT, and this effect was blocked by strychnine (STN). Finally, with behavioral studies we found that KI mice were similar to WT in control conditions, but when the test of loss of righting reflex (LORR), KI mice shows less sedation time to high concentrations of ethanol (3.5 g / kg). In addition, KI animals show higher consumption and preference to ethanol. In conclusion, this thesis helps us to understand the role of  $\alpha 1$  GlyR in the reward system, in order to analyze the physiological action of ethanol in the pathological development of alcohol abuse and alcoholism.

## Introducción

El etanol es una molécula de estructura química simple y que ha sido usado en forma documentada por el hombre desde tiempos bíblicos. Desde tribus primitivas, hasta las sociedades contemporáneas, etanol tiene presencia en todos los grupos y estratos sociales, no siendo considerada como sustancia de abuso o droga, sino como un elemento de recreación en eventos sociales. El consumo de alcohol depende de múltiples factores como predisposiciones genéticas, entornos ambientales, el contexto social e historial farmacológico (McKeon et al., 2008). Todo esto puede llevar a desarrollar un proceso adictivo, del cual no se conocen los mecanismos exactos (Harris, 1999; McKeon et al., 2008). De esta manera, numerosos grupos de investigación han intentado elucidar este fenómeno, planteándose dos preguntas fundamentales: 1.- **¿Cuáles son los factores biológicos que facilitan el consumo agudo de alcohol y condicionan su etapa crónica?** Y 2.- **¿Cuáles son los cambios que se generan en el sistema nervioso central durante la intoxicación aguda y de su abuso prolongado?** Desde décadas se ha investigado para entender como el etanol puede alterar específicamente la función de distintos receptores del sistema nervioso central (Harris, 1999). Esto porque el alcoholismo es uno de los mayores problemas de salud, que afectan a millones de personas en el mundo, causando grandes gastos médicos y económicos. Etanol es una droga depresora que a concentraciones intoxicantes deteriora la mayoría de las funciones cerebrales, incluyendo la planificación ejecutiva, la conciencia, el control muscular y la memoria (Spanagel, 2009). Junto a esto, tanto el control respiratorio y cardiovascular son afectados por

dosis letales de etanol. Una de las hipótesis mayormente aceptadas, es que etanol interfiere con proteínas de membrana alterando sus funciones excitatorias y/o inhibitorias (Jia et al., 2008; Lovinger et al., 1989; Lovinger and White, 1991; Mihic et al., 1997). Es por ello, que se entiende que la adicción al consumo de alcohol es una conducta compleja y que por lo tanto, no se puede modelar o representar en su totalidad en animales. Sin embargo, se han desarrollado distintas técnicas para emular o reproducir el modelo humano en animales (Blednov et al., 2011; Chandra et al., 2007; Mihalek et al., 2001; Sanchis-Segura et al.; Wadleigh and Valenzuela, 2011; Werner et al., 2006). Por ejemplo, se ha estudiado como el etanol altera específicamente la función de distintos receptores del sistema nervioso central, y esto se ha focalizado en un interés en la familia de los Canales Iónicos Activados por Ligando (LGIC), que está compuesta por los receptores de la familia cys-loop como el receptor nicotínico de acetilcolina (R-nACh), serotonina (R-5HT<sub>3</sub>), de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (R-GABA<sub>A</sub>) y de Glicina (R-Gli) (Dopico and Lovinger, 2009; Forman and Miller, 2011; Harris, 1999; Weight et al., 1991) y receptores ionotrópicos de glutamato como AMPA (R-AMPA) y NMDA (R-NMDA) (Rao and Finkbeiner, 2007). Estos receptores comparten una gran homología y median diversos procesos en el sistema nervioso central, tales como, razonamiento, lenguaje, emociones, control del ritmo, regulación de la presión arterial y balance electrolítico; regulación del ciclo circadiano; recepción sensorial de sonidos, luz, olores, y tacto; y, por supuesto, generación, propagación, e integración de las señales eléctricas en el cerebro y sistema nervioso periférico (Baenziger and Corringer, 2011; Bertaccini and Trudell, 2002; Corringer et al., 2009; Maksay,

2009; Miller, 2000). Estas funciones hacen de la súper-familia LGIC un principal blanco para explicar el rol o la acción de etanol en el cerebro y para entender los efectos y cambios en comportamiento que experimenta un individuo que ha consumido etanol.

### **1.- Receptor de glicina.**

Durante décadas se han estudiados los efectos de etanol en LGIC (Ávila, 2008; Engle et al., 2015; Jia et al., 2008; Jia et al., 2007; Lima-Landman and Albuquerque, 1989; Lovinger et al., 1989). Sin embargo, los últimos años ha tomado fuerza el R-Gli, que es principal receptor inhibitorio en regiones espinales (Aguayo et al., 2014; Avila et al., 2013; Blednov et al., 2015; Borghese et al., 2012; Burgos et al., 2015; Mariqueo et al., 2014; McCracken et al., 2010; Naito et al., 2015; Sanchez et al., 2015; Yevenes and Zeilhofer, 2011b). Este receptor se activa mediante la unión de glicina e inicia un cambio conformacional que produce la apertura del poro central, incrementando la conductancia de iones  $\text{Cl}^-$  e iniciando la hiperpolarización de la membrana en neuronas maduras, así previniendo la despolarización y generación de potenciales de acción (Betz et al., 1993). De forma similar al  $\text{R-GABA}_A$ , R-Gli está compuesto por 5 subunidades, la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha 1-4$ ) puede formar homopentámeros. Mientras que la subunidad  $\beta$  es estructural y forma heteropentámeros con las subunidades  $\alpha$ . La estequiometría de los heteropentámeros ha sido principalmente establecida como  $2\alpha 1-4:3\beta$  (Betz and Laube, 2006). Las subunidades del receptor de glicina muestran una alta homología con las subunidades de los otros LGIC ( $\text{R-nAChs}$ ,  $5\text{-HT}_3$  y  $\text{R-GABA}_{A/C}$ ) (Betz and Laube, 2006; Cascio, 2006). Las subunidades de R-Gli están formadas

por un gran dominio extracelular N-Terminal, 4 dominios transmembranas (TM1-TM4), un loop intracelular (LI) entre TM3 y TM4 y un corto dominio extracelular C-Terminal. Estas subunidades presentan una alta homología en los segmentos transmembranas y la región Cys-loop que se localiza en el dominio extracelular N-Terminal (Betz et al., 1993; Betz and Laube, 2006). La región Cys-loop es una secuencia de 13 residuos flanqueados por cisteínas, las cuales se unen covalentemente formando un loop cerrado (Sine and Engel, 2006). El segmento TM2, se ha relacionado con el canal iónico, el cual en R-Gli y R-GABA<sub>A/C</sub>, muestra una relativa selectividad a aniones ( $I^- > Br^- > Cl^-$ ) y una alta permeabilidad a bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) (Betz and Laube, 2006).

Distintas moléculas actúan sobre R-Gli, siendo su neurotransmisor glicina el principal agonista. Además, taurina y  $\beta$ -alanina actúan como agonistas parciales del receptor, mientras que el alcaloide estricnina actúa como un potente antagonista competitivo (Legendre, 2001). Entre los compuestos que modulan la actividad del receptor, se incluyen Zinc, n-alcoholes, anestésicos generales, picrotoxina (PTX), cocaína, algunos anticonvulsivos (Cascio, 2004; Cascio, 2006; Leite and Cascio, 2001; Ren et al., 1999), neurosteroides (Maksay et al., 2001), PKC, PKA (Mascia et al., 1998; Song and Huang, 1990; Specht et al., 2011) y G $\beta\gamma$  (Yevenes et al., 2006; Yevenes et al., 2003). La función de R-Gli es la inhibición del SNC, teniendo la transmisión glicinérgica un rol primordial en el procesamiento de información motora y sensorial que controla el movimiento, visión, audición (Lopez-Corcuera et al., 2001) y sensibilización de dolor

inflamatorio (Harvey et al., 2004). Interesantemente, todas estas funciones son alteradas durante la intoxicación por etanol.

## **2.- Modulación de R-Gli por etanol.**

### **2.1- Efectos de etanol en la transmisión glicinérgica fásica.**

Diversos estudios, han demostrado evidencias del rol de la inhibición glicinérgica fásica en el procesamiento sensorial, esos estudios se han hecho en distintas cepas de ratones mutantes para R-Gli (espasmódicos, osciladores y espásticos) los cuales poseen mutaciones en las subunidad  $\alpha_1$  de R-Gli (espasmódicos, osciladores) o en la subunidad  $\beta$  (espásticos) (Buckwalter et al., 1994; Mulhardt et al., 1994; Ryan et al., 1994). Estos ratones no sólo muestran un elevado tono muscular, sino que también se observa un fuerte fenotipo hiperpléxico, que afecta la transmisión neuronal de las vías motoras que aumentan sus descargas debido a la deficiencia del mecanismo inhibitorio glicinérgico, muy parecido a algunas enfermedades humanas epileptogénicas (Koch et al., 1996). De hecho, mutaciones en genes que codifican para la subunidad  $\alpha_1$  de R-Gli, han sido relacionadas a pacientes que presentan enfermedad de Hiperplexia/convulsiones (Rees et al., 2001). En las enfermedades antes discutidas, la función de R-Gli es afectada a través de mutaciones hereditarias, ediciones de ARN o modificaciones post-transduccionales, como fosforilación (Dworakowska and Dolowy, 2000; Yevenes and Zeilhofer, 2011a). Además, los canales iónicos activados por ligando son blancos de una amplia gama de compuestos usados como fármacos, drogas o toxinas (Jia et al., 2008; Kitson, 2007; Lovinger et al., 1989), los cuales aún no

están totalmente clarificadas. Los efectos de etanol en  $\alpha 1$  R-Gli son relevantes para la salud humana, debido a que causa alteraciones motoras, respiratorias y cardiovasculares (Chang and Martin, 2011; Krowicki and Kapusta, 2011; Ren and Greer, 2006; Schmid et al., 1991), posiblemente alterando la permeabilidad de  $\text{Cl}^-$  en corrientes sinápticas (Eggers and Berger, 2004; Mariqueo et al., 2014; Sebe et al., 2003).

El receptor de glicina es sensible a bajas concentraciones de etanol (30 mM) en el tronco encefálico (Eggers et al., 2000; Sebe et al., 2003). Además, etanol es capaz de aumentar la amplitud de las corrientes de glicina por cambio en la afinidad aparente del receptor a su ligando (Absalom et al., 2003). Por otro lado, se ha reportado que el R-Gli no es afectado por etanol en neuronas espinales inmaduras (Tapia and Aguayo, 1998) y este efecto estaría asociado a que el receptor presenta una forma monopentamérica  $\alpha_2$  o heteropentamérica  $\alpha_2\beta$ , mientras que en neuronas maduras de más de 12 DIV son de una forma heteromérica  $\alpha_1\beta$  (Aguayo et al., 2004; van Zundert, 2003). Paralelo a estos cambios sinápticos, también se observan cambios en la modulación por moléculas como estricnina,  $\text{Zn}^{2+}$  y etanol, siendo más activos en neuronas maduras. Estos cambios se pueden explicar, por el cambio de subunidad que experimentan las neuronas espinales maduras y también la modificación de la sensibilidad a la modulación de la Proteína quinasa C (PKC), debido a que las neuronas maduras son altamente sensibles a la modulación por PKC (Aguayo et al., 2004).

Lo anterior ha sido confirmado también en neuronas del hipogloso en diferentes estados de desarrollo (Eggers et al., 2000). Estos estudios también han

demostrado que mientras etanol aumenta la amplitud de las corrientes sinápticas en neuronas maduras, no hay cambios en la conductancia del canal (Eggers et al., 2000). Interesantemente, cerca de un 50 % de neuronas espinales de ratón (11 de 19 neuronas) son sensibles a los efectos de etanol, esto reflejado en un aumento de la constante de decaimiento de los eventos glicinérgicos en miniatura (mIPSCs) (aumenta un  $30 \pm 10\%$ ) (Mariqueo et al., 2014). Por lo tanto, se ha demostrado que etanol potencia los R-Gli en cerebro mamífero y neuronas espinales (Aguayo and Pancetti, 1994). Otros estudios han corroborado este hallazgo (Davies et al., 2003; Jia et al., 2008). Estos efectos son reversibles y están asociados a un cambio hacia la izquierda en la curva concentración respuesta a glicina (incremento de la afinidad aparente al ligando) (Aguayo et al., 1996). Interesantemente, los R-Gli no sólo han sido encontrados en médula espinal y tronco encefálico, sino que también en regiones supra espinales como corteza, hipocampo, amígdala, VTA y nAc y serían sensibles a etanol (Chau et al., 2010a; Li et al., 2012). Por ejemplo, en neuronas postnatales del área tegmental ventral (VTA), se demostró que R-Gli es sensible a bajas concentraciones de etanol (Ye et al., 2001). Estos resultados sugieren que el aumento en la sensibilidad del receptor a etanol está relacionado al incremento de expresión de la subunidad  $\alpha_1$  que es más sensible a etanol que la subunidad  $\alpha_2$ . Debido a que en receptores recombinantes se ha demostrado que  $\alpha_2$  es insensible a etanol y que los efectos de etanol se deben principalmente a la subunidad  $\alpha_1$  (Yevenes et al., 2010) (Tabla 1).



Por otro lado, estudios de comportamiento, han demostrado que las acciones intoxicantes de etanol fueron significativamente antagonizados por aplicaciones en el cerebro de picrotoxina (PTX) (Durcan and Lister, 1989) y estriquina (STN), dos potentes y selectivos antagonistas de R-GABA<sub>A</sub> y R-Gli, respectivamente (Smith et al., 1989; Williams et al., 1995). Además, STN fue efectivo reduciendo los efectos de etanol en la pérdida del reflejo de enderezarse (LORR) (Williams et al., 1995). Estos resultados apoyan la idea que R-Gli son esenciales para las acciones inhibitorias de etanol en el cerebro y que la neurotransmisión glicinérgica juega un rol en los efectos de etanol y podría ser un nuevo mecanismo para el desarrollo de drogas en contra del alcoholismo y abuso de alcohol.

## **2.2- Efectos de etanol en la transmisión glicinérgica tónica.**

Como se detalló en el punto anterior, existen los receptores sinápticos caracterizados por ser de rápida acción, pero además existen los no-sinápticos, que median la corriente tónica. Estos receptores no-sinápticos están localizados fuera al sitio activo de la sinapsis y responden a bajas concentraciones de ligando, por lo que son de alta afinidad (Bright and Smart, 2013). Recientemente se ha demostrado la presencia de corrientes tónicas inhibitorias mediadas por glicina, los cuales estarían mediados por los transportadores de glicina neuronal y glial que mantendrían el balance excitatorio-inhibitorio de la red neuronal (Badanich et al., 2013; Harvey and Yee, 2013; Maguire et al., 2013, 2014; Salling and Harrison, 2014). Específicamente, los niveles de glicina, tanto extracelular como en las vesículas sinápticas, son mediados por difusión y/o recaptación (Vandenberg et al., 2014). La recaptación de glicina es realizada por transportadores de glicina

(GlyT; del inglés Glycine Transporter), los cuales pertenecen a la familia de transportadores dependientes de sodio/cloruro (Zahniser and Doolen, 2001). Dos genes codifican para distintas isoformas de GlyT: GlyT1a-c, e-f y GlyT2a-b (Gadea and Lopez-Colome, 2001; Zahniser and Doolen, 2001). GlyT1, está distribuido ampliamente en el sistema nervioso central y está localizado principalmente en células gliales (Harvey and Yee, 2013; Vandenberg et al., 2014). GlyT2 es predominantemente expresado en la membrana pre sináptica de neuronas en regiones como médula espinal, tronco encefálico y cerebelo, donde está asociado con receptores de glicina post sinápticos y es por ello, que es considerado como un marcador específico de neuronas glicinérgicas (Harvey and Yee, 2013).

GlyT1 y GlyT2 contribuyen al control de los niveles de glicina. Mientras GlyT1 mantiene los niveles extracelulares de glicina, GlyT2 se encarga de recaptar altas concentraciones de glicina en los terminales presinápticos (Bradaia et al., 2004). Por otro lado, glicina es transportada hacia dentro de las vesículas sinápticas por el transportador de aminoácido inhibitorio vesicular (VIAAT) (Bradaia et al., 2004). Por lo tanto, la regulación de la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria requiere de actividades coordinadas entre GlyT1 y GlyT2.

El rol de los transportadores gliales y neuronales de glicina se ha estudiado mediante electrofisiología. La aplicación de Org24598 y Org25543, antagonistas específicos para GlyT1 y GlyT2, respectivamente, indujeron un aumento de la corriente basal a -10/-50 pA en neuronas de la lámina X de médula espinal. Además, ambos incrementaron significativamente la constante de decaimiento de corrientes post sinápticas inhibitorias miniaturas (mIPSCs), espontáneas (sIPSCs)

y eléctricamente evocadas (eIPSCs). Interesantemente, sólo Org25543 disminuyó la frecuencia de mIPSCs y sIPSCs (Bradaia et al., 2004), dado por la inhibición de la recaptación de glicina en la presinapsis. Es por esto, que el mantenimiento de los niveles de glicina (extracelulares y presinápticos) es importante para controlar el balance excitatorio/inhibitorio de la red neuronal, función en los cuales GlyT1 y GlyT2 son fundamentales mediando la transmisión glicinérgica fásica (GlyT2) y tónica (GlyT1).

Otros estudios recientes han demostrado la presencia de corrientes inhibitorias tónicas glicinérgicas en la corteza orbito frontal lateral (OFC) (Badanich et al., 2013). Así, en rebanadas de OFC de ratón (C57BL/6J) que fueron expuestas a etanol (66 mM) mostraron un incremento en la corriente basal, que fue inhibido por estriquina (Badanich et al., 2013). Este aumento de la corriente basal estaría dado por bajas concentraciones de glicina extracelular, sugiriendo la presencia de una corriente inhibitoria tónica sensible a estriquina y etanol.

### **3.- Los efectos de etanol en R-Gli $\alpha$ 1 pueden ser explicados por dos mecanismos.**

Se ha postulado que el receptor de glicina puede ser modulado por etanol por medio de dos mecanismos diferentes: modulación directa o indirecta. Sin embargo, el significado fisiológico de estos mecanismos no han sido definidos aún. Es por ello, que la interrogante es: **¿Cuál de estos mecanismos son requeridos para desarrollar los efectos moleculares y celulares inducidos por etanol?**

### **3.1- Modulación directa de etanol en R-Gli $\alpha_1$ mediante bolsillo de unión y dominio extracelular:**

Uno de los mecanismos propuestos por el cual etanol potencia la función del receptor fue postulado por Mihic, Harrison y Harris (Mihic et al., 1997). Este mecanismo de acción involucra **un bolsillo de unión a etanol en R-Gli y R-GABA<sub>A</sub>** (Mihic, 1999; Mihic et al., 1997; Wick et al., 1998). En estos estudios, se realizaron mutaciones en aminoácidos implicados en la formación del canal y en la conformación del pentámero, como son las mutaciones en los residuos S267 de TM2 y A288 en el TM3 de la subunidad  $\alpha_1$ . La mutación de estos residuos afectó la modulación por etanol en comparación al receptor nativo, pero también modificó su sensibilidad a otros alcoholes y anestésicos (Lobo et al., 2006; Mascia, 2000; Mascia et al., 1996; Wick et al., 1998; Ye et al., 1998), indicando que estos residuos no son específicos para la modulación por etanol, sino que comparten también su función con otros moduladores alostéricos (anestésicos generales y n-alcoholes) (Mascia, 2000). Además, interfieren en las propiedades fisiológicas del receptor alterando la apertura del canal (Mascia, 2000).

También ha sido reportado que el dominio extracelular es un sitio importante de activación del canal, ya sea por glicina, o por moduladores alostéricos como zinc y estricnina (Laube et al., 2002). Estudios en sistemas de expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis*, han demostrado que etanol también ejerce su efecto a través de residuos en el dominio extracelular (Crawford et al., 2007). En un principio, considerando que  $\alpha_1$  es más sensible a etanol que  $\alpha_2$  (Tapia and Aguayo, 1998), se encontró que el reemplazo de una alanina por una serina en la

posición 52 (A52S) le confiere menor sensibilidad a R-Gli  $\alpha_1$  (Crawford et al., 2008; Crawford et al., 2007; Davies et al., 2004; Davies et al., 2003; Perkins et al., 2009). Posteriormente, se ha demostrado que cambiando la treonina de la posición 59 de R-Gli  $\alpha_2$  a alanina (T59A), la sensibilidad a etanol se incrementa llegando a niveles cercanos a la potenciación observada en R-Gli  $\alpha_1$  (Perkins et al., 2008). Estos estudios sugieren como potenciales sitios de modulación de etanol los residuos A52 y T59. Estudios recientes, usando distintas mutaciones en el loop 2 de la región extracelular, determinaron la posibilidad de generar R-Gli  $\alpha_1$  “ultra” sensibles a etanol y a anestésicos generales como isoflurano y lidocaína (Naito et al., 2015).

Por otro lado, con la intención de evaluar los efectos de etanol en los residuos TMs, se realizaron estudios de comportamientos en animales Knock-In (KI), que presentan la mutación S267Q, demostraron que estos animales (KI) tenían convulsiones y morían a las 3 semanas, **mientras que el genotipo heterocigoto (HZ) generaba hiperplexia** (Findlay et al., 2005; Findlay et al., 2003). Interesantemente, la generación de un modelo animal que presenta la mutación en el TM2, demostró que **este residuo no sólo es importante para la modulación del receptor por etanol, sino que también posee relevancia en la función fisiológica “normal” del receptor**. Sin embargo, aun con estos efectos complejos, se definió que el efecto de etanol es dependiente de un bolsillo de unión funcional que se forma entre el DEC, TM2 y TM3 del receptor. Además, este bolsillo de unión a etanol tendría efectos clínicamente relevantes. Sin embargo, debido a los cambios basales en la fisiología del receptor, la relevancia de estos

estudios está siendo discutida actualmente. Debido a que es muy posible que este ratón presente compensaciones neuronales, como resultado de su notorio aumento en la excitabilidad, lo cual no ha sido estudiado. Adicionalmente, el tema de compensaciones es habitualmente considerado cuando la mutación no es silente y se experimentan cambios en el comportamiento de manera significativa (Harris et al., 2011).

### **3.2- Modulación indirecta de R-Gli $\alpha 1$ a través de heterodímero $G\beta\gamma$ de la proteína G.**

La segunda alternativa, es que R-Gli es afectado por etanol en una forma dependiente de  $G\beta\gamma$ . En el modelo clásico de señalización por activación de proteína G, se describe un receptor acoplado a proteína G (GPCR) que posee siete hélices transmembrana, un dominio extracelular de unión a ligando y una superficie expuesta hacia el lado citoplasmático que entra en contacto con la proteína G, formada por el heterotrímero  $G\alpha\beta\gamma$  (Ford, 1998; Weiner et al., 1994). El GPCR unido a su agonista actúa como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), promoviendo la liberación de GDP desde la subunidad  $G\alpha$ . La subunidad  $G\alpha$  intercambia GDP por GTP, que está presente en exceso en la célula. La unión de GTP resulta en cambios conformacionales que traen como consecuencia la disociación del dímero  $G\beta\gamma$  (Oldham and E. Hamm, 2006). Tanto  $G\beta\gamma$  como la subunidad  $G\alpha$  unida a GTP pueden iniciar la señalización intracelular al activar o inhibir efectores intracelulares (McCudden et al., 2005; Oldham and E. Hamm, 2006).

El primer canal iónico para el que se demostró una interacción directa al heterodímero  $\beta\gamma$  fue el canal rectificador de entrada de potasio (GIRK o Kir3) el cual es activado por  $G\beta\gamma$  (Logothetis et al., 1987). El canal GIRK es un canal de potasio que desempeña una importante función en la regulación del ritmo cardíaco en respuesta a acetilcolina (ACh) y cuya principal característica es conducir preferentemente potasio hacia el interior, siendo su activación, dependiente de la activación de proteínas G heterotriméricas (Chen and Johnston, 2005; Fischer et al., 2005; Logothetis et al., 1987). En el caso de los LGIC se ha demostrado modulación por el dímero  $G\beta\gamma$  en los receptores ionotrópicos de acetilcolina (R-nACh),  $GABA_A$ ,  $GABA_C$  y Glicina (Allan et al., 1991; Feigenspan and Bormann, 1994; Fischer et al., 2005; Weiner et al., 1994; Yevenes et al., 2003). De los estudios más completos,  $G\beta\gamma$  mostró potenciar la actividad del receptor de glicina al aumentar la afinidad aparente del receptor por glicina, resultando en un aumento en la probabilidad de apertura del canal (Yevenes et al., 2003).

De los resultados derivados en estudios tempranos, se propuso que concentraciones clínicamente relevantes de etanol (10 – 100 mM) potencian la corriente de cloruro asociada a glicina por medio de un mecanismo post-transduccional (Aguayo and Pancetti, 1994; Aguayo et al., 1996). Por ejemplo, la sensibilidad de R-Gli  $\alpha 1$  a etanol fue fuertemente afectada por el estado de activación de la proteína G (Aguayo et al., 1996; Zhu and Ye, 2005). Así, la aplicación de GTP- $\gamma$ -S intracelular (análogo no hidrolizable de GTP), aumenta la sensibilidad del receptor a etanol. Por su parte, GDP- $\beta$ -S (análogo no hidrolizable de GDP), causa una completa inhibición de la potenciación (Aguayo et al., 1996).

Estudios posteriores, identificaron residuos que están involucrados en la modulación de R-Gli por  $G\beta\gamma$  en el loop intracelular (LI). Se han determinado que los residuos básicos  $^{316}\text{RFRRK}^{320}$  y  $^{385}\text{KK}^{386}$  en el loop intracelular (LI) estarían implicados en la modulación del R-Gli  $\alpha 1$  por  $G\beta\gamma$  (Yevenes et al., 2006; Yevenes et al., 2008). Mediante análisis de interacción por GST pull-down, se demostró que  $G\beta\gamma$  es capaz de unirse a la subunidad  $\alpha 1$ , mientras que mutaciones dirigidas a los residuos  $^{316}\text{RFRRK}^{320}$  y  $^{385}\text{KK}^{386}$  disminuyen significativamente unión al receptor (Yevenes et al., 2008). Al realizar análisis electrofisiológico, se demostró a través de la activación de la proteína G con GTP- $\gamma$ -S, la importancia de estas dos regiones aminoacídicas en la modulación del receptor, ya que, las mutaciones dirigidas a estos residuos causan insensibilidad a la modulación por activación de proteína G (Yevenes et al., 2003). Además, se demostró que estas dos regiones de aminoácidos básicos ( $^{316}\text{RFRRK}^{320}$  y  $^{385}\text{KK}^{386}$ ) son importantes para la modulación inducida por  $G\beta\gamma$  del efecto de etanol, convirtiendo un receptor sensible a etanol (receptor nativo) a una forma resistente a esta modulación (mutaciones 316-320A y 385-386A). Para caracterizar en más detalles los efectos de etanol en R-Gli, se realizaron registros electrofisiológicos de canal único en la configuración outside-out. En este estudio, se usaron aplicaciones de 10 mM de etanol en el receptor nativo de glicina, donde se observó un aumento significativo de la probabilidad de apertura ( $121\pm 22$  % sobre el control) no encontrando cambios en la conductancia (Yevenes et al., 2008). Al contrario, la mutante resistente a etanol (385-386A) posee similares parámetros de probabilidad de apertura y niveles estables de conductancia en comparación con el receptor nativo



(Yevenes et al., 2008). Así, estos resultados demuestran que las mutaciones en estos sitios del loop intracelular no causan cambios en la función del canal, sino que sólo modifican la sensibilidad del receptor a etanol. Además, se verificó el efecto de estas mutaciones en la modulación sobre el receptor ejercida por anestésicos generales y otros n-alcoholes, como butanol; los cuales no vieron afectada su capacidad moduladora sobre el receptor sugiriendo un mecanismo altamente selectivo a etanol (Yevenes et al., 2006; Yevenes et al., 2008). Adicionalmente, se determinó la capacidad de reducir la sensibilidad a bajas concentraciones de etanol, en R-Gli wild-type, mediante la expresión de péptidos secuestrantes de  $G\beta\gamma$  (ct-GRK2, RQH y RQHc7) (Guzman et al., 2009; San Martin et al., 2013) o también por la sobre-expresión de subunidades  $G\alpha$  unidas a GDP, las cuales potencialmente unen a  $G\beta\gamma$  libre (Yevenes et al., 2008). Todos estos datos, demuestran que los aminoácidos básicos del LI regulan la sensibilidad de R-Gli  $\alpha 1$  a concentraciones fisiológicamente relevantes de etanol.

Por lo tanto, **se ha sugerido que la activación de proteína G sería un evento determinante en la modulación de los R-Gli inhibitorios en el SNC.**

#### **4.- Receptor de glicina en diversas regiones del SNC.**

Tradicionalmente, se ha demostrado la presencia de R-Gli en médula espinal (Aguayo et al., 1996; Aguayo et al., 2004; Bradaia et al., 2004; Mariqueo et al., 2014; Tapia and Aguayo, 1998; van Zundert et al., 2005) y tronco encefálico (Aguayo et al., 2014; Eggers and Berger, 2004; Eggers et al., 2000; Sebe et al., 2003), pero estudios recientes han encontrado R-Gli en áreas supraespinales del

cerebro, como la corteza orbito frontal (OFC) (Badanich et al., 2013), raphe (Maguire et al., 2014), corteza prefrontal (PFC) (Lu and Ye, 2011; Salling and Harrison, 2014), área tegmental ventral (VTA) (Li et al., 2012; Ye et al., 2001) y nucleus accumbens (nAc) (Chau et al., 2010a; Chau et al., 2010b; Jonsson et al., 2014; Molander and Soderpalm, 2005). En donde, se determinó y evaluó la presencia de R-Gli no-sinápticos que activan corrientes tónicas sensibles a etanol (OFC, PFC, raphe), y la capacidad de R-Gli de modular la liberación de dopamina (DA) en el sistema de recompensa del cerebro (nAc y VTA). Lo anterior, apoya la idea que las corrientes mediadas por R-Gli en regiones supraespinales y principalmente en el sistema de recompensa (nAc-VTA), podrían participar en los efectos de etanol, lo que puede ser un nuevo mecanismo para el desarrollo de drogas para enfrentar el abuso alcohólico y alcoholismo, **pero se desconoce qué tipo de subunidades conforman los R-Gli en estas regiones.**

#### **4.1- Sistema de recompensa del cerebro**

En 1954, James Olds y Peter Milner descubrieron, mediante electrodos implantados en distintas áreas (área septal, corpus callosum, hipocampo, lemnisus medial, tracto Mamilotalámico, geniculado medial) del cerebro de ratas, que podían ser auto estimulados o prevenir la estimulación de varias regiones específicas (Olds and Milner, 1954). Los investigadores denominaron las áreas, donde las ratas eran autoestimuladas, como “estructuras de refuerzo”. Las estructuras de refuerzo fueron anatómicamente mapeadas y redefinidas como el sistema de recompensa del cerebro (Milner, 1991; Olds, 1963).

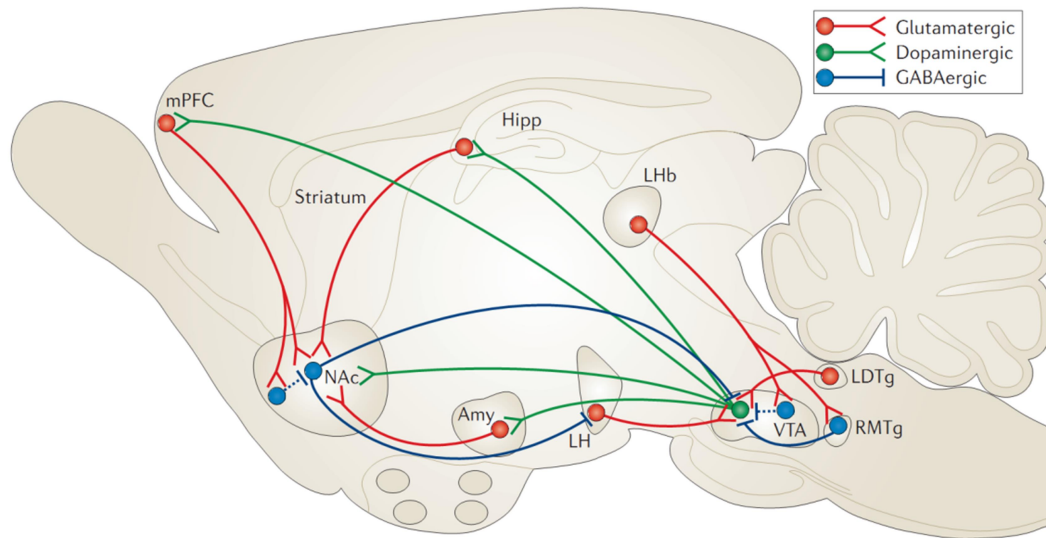
El sistema de recompensa del cerebro está estrechamente conectado con neurocircuitos envueltos en aprendizaje y memoria (Hyman et al., 2006), siendo esencial para la sobrevivencia de las especies, ya que se encuentra altamente conservado en el reino animal (Hyman et al., 2006). Es por ello, que motiva al individuo para recompensas naturales o vitales como el beber, comer y copular (Kelley and Berridge, 2002). Además, este mismo sistema es activado por estímulos y/o recompensas no vitales, como drogas de abuso y estímulos compulsivos (adicción a compras, ludopatía, sobrealimentación) (Kelley and Berridge, 2002). Es por ello que las conexiones entre procesos de memoria y aprendizaje son importantes para recompensas naturales, pero son devastadoras en adicciones.

#### **4.2- Sistema mesolímbico dopaminérgico en relación a etanol.**

Distintos neurocircuitos y neurotransmisores están implicados en los efectos de recompensa de drogas de abuso, pero la mayor vía neuroquímica del sistema de recompensa es el sistema mesolímbico dopaminérgico (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005).

La vía mesolímbica dopaminérgica es el sustrato central para recompensa (reward) en el SNC, y consiste en células neuronales dopaminérgicas del tipo A10 que se proyectan desde el VTA al nAc y PFC (Lu and Ye, 2011; Molander et al., 2005; Söderpalm et al., 2009; Zhu and Ye, 2005). Interesantemente, las proyecciones dopaminérgicas de VTA las reciben, neuronas espinosas medianas (del inglés: medium spiny neurons; MSNs) y son moduladas diferencialmente por DA (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Liang et al., 2014). DA afecta la transmisión

en el nAc vía distintos subtipos de receptores de dopamina (DAR) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Los DAR son receptores acoplados a proteína G (GPCR), los de tipo D1 (D1Rs y D5Rs) están acoplados a  $G_{\alpha_s}\beta\gamma$  y aumentan los niveles de cAMP, mientras que los D2 (D2R, D3R y D4R) están acoplados a  $G_{\alpha_{i/o}}\beta\gamma$  y disminuyen cAMP. La expresión de DARs D1 esta principalmente en MSNs GABAérgicas que se proyectan directamente al VTA, mientras que los de tipo D2 se expresan en MSNs que se proyectan al pallidum ventral (VP) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011) (Figura 1). Las MSNs del nAc tienen un rol central en la integración de aferentes corticales, talámicos y mesencefálicos y forman parte de entre el 90 a 95 % del striatum (Beaulieu and Gainetdinov, 2011) (Figura 1). Además las MSNs están involucrados en varios aspectos de comportamiento, como control del movimiento (Bjorklund and Dunnett, 2007), motivación (Macpherson et al., 2014) y adicción (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005). Alcohol como otras drogas de abuso, agudamente activan el sistema mesolímbico dopaminérgico y bajo administraciones crónicas produce alteraciones funcionales de esta importante área del sistema de recompensa del cerebro (Di Chiara, 2002; Söderpalm et al., 2009). Es por ello, que son un blanco de desarrollo terapéutico para el abuso al alcohol y alcoholismo.



**Figura 1. Esquema del circuito de recompensa VTA-nAc.**

El esquema resume las principales conexiones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas desde y hacia el VTA y nAc en el cerebro de ratón. El circuito principal de recompensa, incluye proyecciones dopaminérgicas desde el VTA a nAc, en donde se libera dopamina en respuesta a un estímulo relacionado con la generación de placer. También hay proyecciones GABAérgicas desde el nAc al VTA; proyecciones por vía directa (mediadas por MSNs D1) que inervan directamente al VTA, y proyecciones vía indirecta (mediadas por MSNs D2) que inervan neuronas del VTA mediante interneuronas GABAérgicas del pallidum ventral. El nAc recibe una densa inervación desde circuitos glutamatérgicos de la corteza prefrontal medial (mPFC), hipocampo y amígdala. Mientras que el VTA recibe inputs desde el Tegmentum lateral dorsal (LDTg), habénula lateral (LHb) e hipotálamo lateral (LH). Las líneas punteadas indican proyecciones internas inhibitorias. (Russo and Nestler, 2013)

#### 4.3- Sistema mesolímbico dopaminérgico y R-Gli.

Los últimos años se ha puesto atención en la función de R-Gli en el sistema mesolímbico dopaminérgico. Interesantemente, estudios recientes han demostrado que agonistas y antagonistas de R-Gli afectan las regiones de recompensa del cerebro (Li et al., 2012; Molander and Söderpalm, 2005a). Es por ello, que **el receptor de glicina ha sido involucrado en la regulación del sistema dopaminérgico en núcleo accumbens (nAc)**, siendo activados tónicamente y regulando los niveles de dopamina (Molander et al., 2005; Molander and Söderpalm, 2005a). Se ha demostrado que la microdiálisis de glicina modula los niveles basales de dopamina, tanto en la ausencia, como en presencia de etanol (Lido et al., 2011). **Además, la administración por microdiálisis de inhibidores para el transportador de glicina de alta afinidad expresados en células gliales (GlyT1), eleva los niveles extracelulares de glicina, lo que conlleva a un aumento de la concentración de dopamina en nAc** (Lido et al., 2011), previniendo además, la elevación adicional de los niveles de dopamina inducidos por etanol y reduciendo el consumo de etanol en ratas (Lido et al., 2011). Estudios recientes realizados en VTA, han demostrado que microinyecciones de glicina (5  $\mu$ M) selectivamente reducen el consumo de etanol, pero no de agua, en ratas que fueron expuestas crónicamente a etanol (Li et al., 2012). Además, se ha demostrado la existencia de R-Gli funcionales en las capas II y III de la corteza prefrontal (mPFC), cuyo rol sería mediar una inhibición tónica que podría tener una influencia importante en la excitabilidad y el procesamiento de la señal en esta área (Salling and Harrison, 2014). Por lo tanto, tanto R-Gli,

GlyT y glicina parecen ser importantes en la red neuronal del sistema de recompensa del cerebro (nAc, PFC y VTA). Estos datos sugieren que R-Gli no sólo afecta al tronco encefálico y médula espinal, sino que también tiene una función importante en el sistema mesolímbico dopaminérgico, pudiendo regular tanto el consumo de alcohol, como el desarrollo del alcoholismo.

Sin embargo, no existe mayor información de la conformación de estos R-Gli, si son sensibles a etanol y como pudiesen regular en consumo y preferencia. Es por ello, que un animal transgénico recientemente descrito (Aguayo et al., 2014), pudiese servir para entender este aspecto de la neurobiología del alcohol.

Este animal fue generado por nuestro laboratorio en colaboración con el Dr. Gregg Homanics de la Universidad de Pittsburg y el Dr. David Lovinger del NIAAA (NIH) desarrollando un animal Knock In (KI) global para R-Gli  $\alpha 1$ , el cual posee la mutación en el receptor en las posiciones 385 y 386, donde los residuos de Lisina originales han sido sustituidos en ambas posiciones por Alaninas, generándose un animal KK385/386AA. La generación de este animal fue realizada principalmente en el laboratorio del Dr. Homanics con técnicas previamente descritas (Werner et al., 2006). Una vez generado el ratón KI, el laboratorio del Dr. Homanics realizó estudios de comportamiento que demostraron que este animal se comporta de manera similar al ratón WT en ausencia a etanol. Sin embargo, en el ensayo de actividad de campo abierto (Werner et al., 2006) que prueba la actividad locomotora del animal, antes y después de la inyección i.p de dosis bajas de etanol (1 g/kg), se observó un aumento significativo de la estimulación en actividad locomotora en el ratón KI (Aguayo et al., 2014). Esta diferencia, puede ser debida

a compensaciones neuronales, por lo cual es importante poder establecer algún grado de estas en ratones KI. Por lo cual, en esta tesis se continuó con la caracterización de las propiedades bioquímicas y funcionales de este ratón, generando tres preguntas específicas:

### **1.- ¿Existe alguna compensación a nivel sináptico en el ratón KI?**

Para responder esta interrogante, caracterizamos la presencia de varias proteínas pre y post sinápticas, relacionadas con la transmisión inhibitoria (R-Gli subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta$ , R-GABA<sub>A</sub> subunidad  $\alpha 1$ , GAD67 y vGAT) (Figura 2a) y excitatoria (R-AMPA subunidad GluR1, PSD95, vGluT y sinaptofisina) (Figura 2b) en distintas regiones del SNC (médula espinal, tronco encefálico, hipocampo y cerebelo). Además, se evaluó y comparó la presencia de agrupaciones de R-Gli  $\alpha 1$  entre ratones WT y KI.

### **2.- ¿Está presente R-Gli y cuál es su función y posible composición en el sistema mesolímbico dopaminérgico (nAc, VTA y PFC)?**

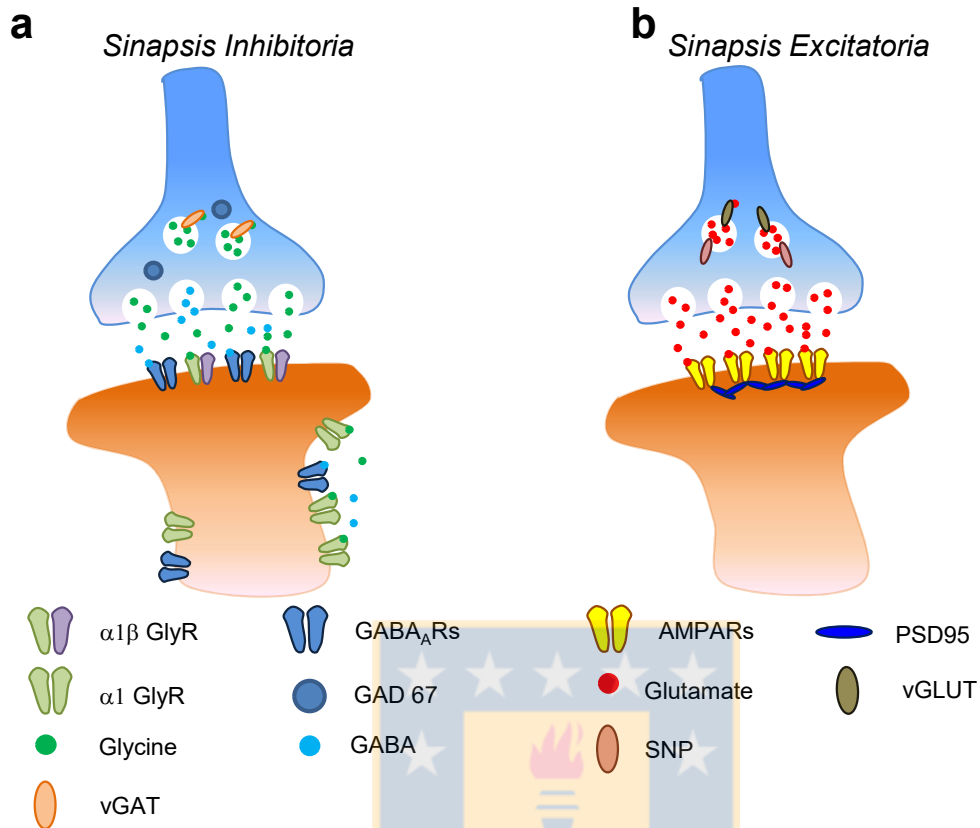
Evaluamos la presencia e importancia de R-Gli en nucleus accumbens, VTA y PFC (Figura 3) para compararlos con los datos electrofisiológicos de estudios previos obtenidos en células de expresión heteróloga HEK 293 (Tabla 1). Además, determinamos la importancia de las corrientes fásicas y tónicas inhibitorias generadas por R-Gli en nAc.



**3.- ¿Son los residuos 385-386 importantes para los efectos de etanol a nivel celular y de comportamiento?**

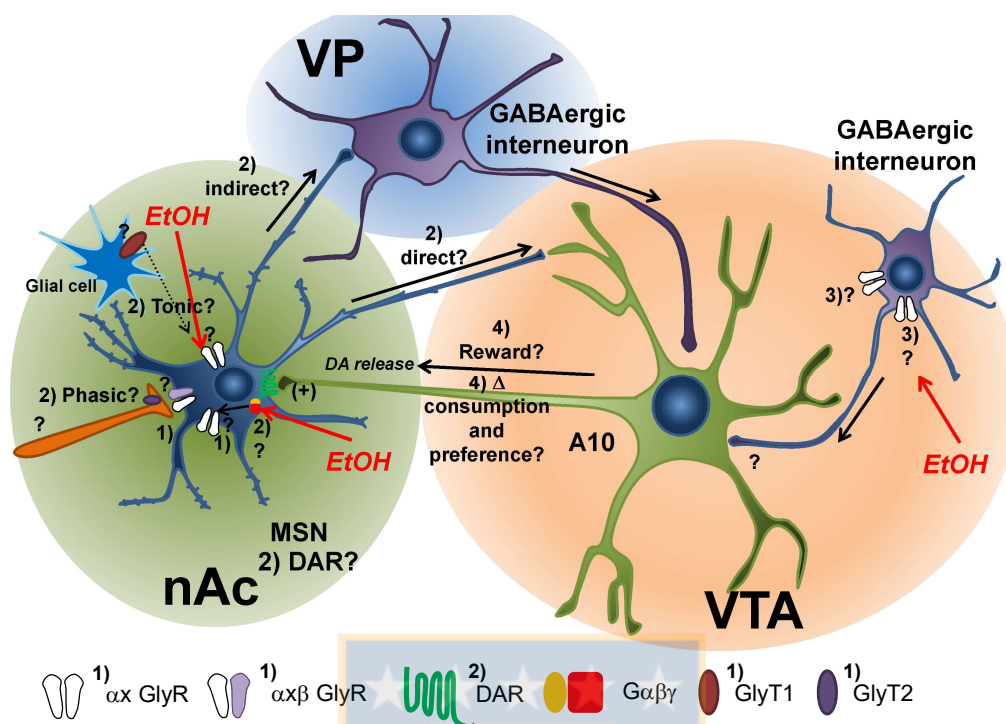
Finalmente, determinamos los efectos de etanol en comportamiento que se relacionan con las propiedades sedativas, de consumo y de preferencia a etanol (Figura 3).





**Figura 2. Esquema de trabajo. Caracterizar la presencia de proteínas pre y post sinápticas en distintas regiones del SNC de ratones WT y KI.**

**a)** Se caracterizará y comparará la presencia de proteínas pre y post sinápticas responsables de la generación de corrientes inhibitorias en médula espinal, tronco encefálico, hipocampo y cerebelo de ratones WT y KI. Además, se evaluará la presencia de R-Gli sinápticos y no-sinápticos. **b)** Se caracterizará y comparará la presencia de proteínas pre y post sinápticas excitatorias en médula espinal, tronco encefálico, hipocampo y cerebelo de ratones WT y KI.



**Figura 3. Esquema de trabajo. Caracterizar la presencia de R-Gli en nAc y determinar las propiedades electrofisiológicas del R-Gli  $\alpha_1$  en neuronas disociadas y en rebanadas de tejido del nAc, PFC y VTA de ratones WT, KI y D1-GFP.**

**1)** Se determinará la presencia de las proteínas necesarias para la generación de corrientes inhibitorias de glicina en animales WT Y KI (GlyT1, GlyT2 y R-Gli). Adicionalmente, se determinará la localización de R-Gli en la neurona accumbal (sináptico o no-sináptico). **2)** Se caracterizará electrofisiológicamente la presencia de corrientes glicinérgicas sinápticas y no-sinápticas, se determinará la sensibilidad a etanol y en qué tipo de MSNs se expresan principalmente (D1 o D2), con el propósito de determinar la vía de comunicación entre nAc y VTA (directa o indirecta). **3)** Se caracterizara la presencia de corrientes mediadas por R-Gli en VTA y PFC. **4)** Se determinará la importancia de los residuos 385-386 en los efectos sedativos, de consumo y de preferencia a etanol.

**TABLA 1. Resumen propiedades electrofisiológicas de los Receptores de glicina expresados en células HEK293**

Glycine Receptor	EC <sub>50</sub> (μM)	nH	I <sub>max</sub> (pA)	% Potentiation (10)	% Potentiation (100)	% Potentiation at 15 min	Reference
α1	46 ± 2	2.5 ± 0.2	3647 ± 324	23 ± 3	53 ± 6	80 ± 10	Yevenes et al, 2006 and 2008
α1KK385-386AA	38 ± 2	2.5 ± 0.3	4162 ± 654	1 ± 1 (***)	9 ± 3 (***)	2 ± 6 (***)	Yevenes et al, 2006 and 2008
α1β	46 ± 2	1.9 ± 0.1	2355 ± 573	14 ± 5	25 ± 5	ND	Datos no publicados
α2	123 ± 3	2.2 ± 0.2	3363 ± 230	-4 ± 4	9 ± 3	-4 ± 7	Yevenes et al, 2010
α2β	48 ± 8	2.1 ± 0.3	3280 ± 471	30 ± 7	87 ± 19	73 ± 11	Datos no publicados
α3S	92 ± 3	2.2 ± 0.2	3510 ± 420	ND	7 ± 2	-59 ± 6	Sanchez et al, 2015
α3L	109 ± 3	2.6 ± 0.2	2041 ± 390	ND	-19 ± 6	-46 ± 6	Sanchez et al, 2015

Los valores representan el promedio ± SEM. Los valores fueron obtenidos en la ecuación:  $I_{\text{glicina}} = I_{\text{max}} \frac{[\text{glicina}]^{\text{nH}}}{([\text{glicina}]^{\text{nH}} + [\text{EC}_{50}]^{\text{nH}})}$  usando el software Origin 8.0.

EC<sub>50</sub>: Concentración de glicina en el que se obtiene el 50% de la respuesta máxima

nH: coeficiente de Hill

I<sub>max</sub>: Corriente máxima en presencia de concentración saturante de glicina (1000 μM)

Los EC<sub>10</sub> calculados para cada R-Gli fue usado para realizar los experimentos de sensibilidad a etanol y de GTP-γ-S. “% Potentiation (10)” corresponde al cambio en presencia de 10 mM de etanol con respecto al control de EC<sub>10</sub> de glicina. “% Potentiation (100)” corresponde al cambio en presencia de 100 mM de etanol con respecto al control de EC<sub>10</sub> de glicina El “% potentiation at 15 min” corresponde al cambio en presencia del análogo no hidrolizable de GTP (GTP-γ-S, 200 mM) medido después de 15 minutos de diálisis intracelular.

ND: No determinado

n>5, \*\*\*p<0.001, One way ANOVA.

## Hipótesis

Por lo tanto, entender el rol de estas mutaciones en un modelo animal (KI) es de importancia para conocer *in vivo* la modulación de R-Gli  $\alpha 1$ , no sólo en centros de regulación motora como la médula espinal o tronco encefálico, sino que también en centros de regulación superiores como el sistema mesolímbico dopaminérgico.

Considerando estos antecedentes proponemos las siguientes hipótesis de trabajo:

**"Los residuos de lisina 385-386 del receptor de glicina determinan los efectos potenciadores inducidos por etanol en las corrientes sinápticas y no sinápticas en el sistema mesolímbico dopaminérgico".**

Estas hipótesis permitirán ayudar resolver las tres importantes preguntas neurobiológicas planteadas anteriormente.



## **Objetivos**

**Objetivo general:** Caracterizar las propiedades fisiológicas y bioquímicas de los residuos KK385-386 del receptor de glicina subunidad  $\alpha 1$  en el sistema nervioso central.

**Objetivo específico 1:** Caracterizar la presencia de proteínas sinápticas en distintas regiones del SNC de ratones WT y KI.

- 1.1 Determinar los niveles de proteínas sinápticas en tejidos de ratones WT y KI (médula espinal, tronco encefálico, hipocampo, cerebelo).
- 1.2 Determinar los niveles de proteínas sinápticas en cultivos de neuronas espinales.
- 1.3 Estudiar las agrupaciones de R-Gli  $\alpha 1$  en membrana de cultivos de neuronas espinales WT y KI.

**Objetivo específico 2:** Caracterizar la presencia de R-Gli en nAc y determinar las propiedades electrofisiológicas del R-Gli  $\alpha 1$  en neuronas disociadas y en rebanadas de tejido del nAc, PFC y VTA de ratones WT, KI y D1-GFP.

- 2.1 Determinar los niveles de mRNA y proteínas glicinérgicas (R-Gli y GlyT) en nucleus accumbens.
- 2.2 Determinar la sensibilidad a glicina en neuronas disociadas de nAc, VTA y PFC.

- 2.3 Determinar los efectos de etanol en neuronas dissociadas de nAc, VTA y PFC.
- 2.4 Determinar los efectos de la activación de proteína G en neuronas dissociadas de nAc, VTA y PFC.
- 2.5 Comparar la sensibilidad a glicina y etanol en medium spiny neurons de ratones D1-GFP en nucleus accumbens
- 2.6 Evaluar parámetros sinápticos en rebanadas de nAc de WT, KI y D1 -GFP.
- 2.7 Determinar los efectos de etanol en IPSCs glicinérgicos en rebanadas de nAc de WT, KI y D1-GFP.
- 2.8 Evaluar las corrientes tónicas en núcleo accumbens de WT, KI y D1-GFP.
- 2.9 Evaluar los efectos de la inhibición y potenciación de R-Gli en la excitabilidad neuronal de neuronas accumbales de ratones WT, KI y D1-GFP.

**Objetivo específico 3: Caracterizar el rol de R-Gli  $\alpha$ 1 en los efectos sedativos, de consumo y preferencia a etanol en ratones WT y KI.**

- 3.1 Evaluar los efectos sedativos en ratones WT y KI.
- 3.2 Determinar el consumo libre a etanol en ratones WT y KI.
- 3.3 Determinar de preferencia a etanol en ratones WT y KI.

## **Materiales y métodos**

### **Ratones**

Protocolos de experimentación y cuidado animal fueron aprobados por el comité asesor de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción y por el Comité de Uso y Cuidado Animal (ACUC) del NIH (National Institutes of Health, Maryland, USA) se siguieron las guías y protocolos éticos de cuidado de animales de experimentación establecidos por NIH.

**Ratón  $\alpha$ 1KK385-386AA KI:** Ratones WT y KI (B6.129S7(SJL)-Gira1<sup>tm3.1Geh</sup>/J) con el alelo  $\alpha$ 1KK385-386AA listo están disponibles en Jackson Laboratories (Stock number 023516; Bar Harbor, ME). En este estudio, los ratones se denominarán como WT (wild type: sin la mutación) y KI (con el alelo  $\alpha$ 1KK385-386AA) (Aguayo et al., 2014). Todos los ratones usados en esta tesis son WT y KI globales de séptima generación de background genético híbrido, los cuales poseen en promedio 0.8% de cepa 129x1/S1 y 99.2% C57BL/6J. Todos los ratones fueron genotipificados mediante extracción de ADN genómico de la cola (Wizard Genomic DNA purification kit, Promega Co. USA) y el uso PCR convencional con partidores KI sense 5'-TTG TAG CAT GGG AAA GCC AGA- 3' y Anti Sense 5'-ATG CTG AAA CAG ATG CAA GCC AGG- 3', la presencia de la mutación se observó a través de gel electroforético con una banda de 400 bp, mientras que en ratones WT con una banda de 300 bp y el animales Heterocigotos (HZ) con una doble banda.



**Ratón D1-GFP:** Cepa de ratón que muestra expresión sitio específica de EGFP (proteína fluorescente verde mejorada) de medusa. La cepa fue desarrollada con BAC (del inglés: Bacterial Artificial Chromosome) modificado que contiene insertado la EGFP cascada arriba del promotor para el receptor de dopamina D1a (Tg(Drd1a-EGFP)x60Gsat/Mmmh). El ratón fue facilitado por el Dr. David Lovinger del NIH/NIAAA, USA.

### **Cultivos primarios de neuronas espinales**

Ratones wild type (WT) y Knock In (KI) fueron tratados de acuerdo a protocolos de ética y cuidado de animales de experimentación establecidos por el NIH (National Institutes of Health, Maryland, USA) y el Comité de Ética de la Universidad de Concepción. Ratonas preñadas de 13-14 días fueron sacrificadas, los embriones rápidamente fueron extraídos y decapitados para obtener aproximadamente 5-6 médulas espinales, mediante disociación mecánica y enzimática se obtuvieron las neuronas para luego ser plantadas en placas de 35 mm con vidrios recubiertos de poli-L-lisina (0.25% P/V, Sigma, USA), a una densidad de 300.000 cels/ml. El medio de cultivo consistió de 90% MEM (minimal esencial medium, GIBCO, USA) y N3, 5% V/V de suero de caballo inactivado por temperatura (GIBCO) y una mezcla de nutrientes previamente descrita (Tapia and Aguayo, 1998). El crecimiento se realizó en una incubadora termo-regulada con 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C, el medio se cambió cada 3 días y los experimentos fueron realizados en neuronas de 10-14 días.

## **Preparación de las rebanadas de cerebro de ratón**

Ratones WT, KI y D1GFP (21-40 días postnatal) fueron decapitados siguiendo protocolo por Jun et al. (2011). El cerebro fue rápidamente disectado y puesto en solución de corte (en mM): 194 Sucrosa, 30 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glucosa (pH 7.4) previamente saturado con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> por 30 minutos, luego se adhirió con cianoacrilato a cámara de corte para rebanar el cerebro en el vibratomo Leica VT1200S (Alemania) y obtener rebanadas de 300 a 400  $\mu$ m. Las rebanadas fueron transferidas a la solución fluido cerebro espinal artificial (aCSF) (en mM): 124 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glucosa, 2 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4 y ajustado con sucrosa a 315-320 mOsm) saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> a 30°C por 1 hora. Así, luego de una hora las rebanadas están listas para ser usadas para ser disociadas o para realizar inmunocitoquímica y electrofisiología.

## **Disociación enzimática de neuronas**

La técnica de disociación resulta en neuronas activas aisladas, que son una buena herramienta de detección de proteínas sinápticas, ya que se pueden observar sinapsis funcionales (Jun et al., 2011). Rebanadas coronales de cerebro que contienen el nucleus accumbens (nAc), área tegmental ventral (VTA) o corteza prefrontal (PFC) fueron incubadas por 20 minutos en aCSF (saturado con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) en presencia de 0.6 mg/ml de pronasa (Calbiochem/EMD Bioscience, Darmstadt, Alemania) a 37 °C. Regiones cerebrales de nAc, VTA o PFC fueron aisladas y transferidas a pocillos de 35-mm con buffer de trituración (en mM): 20

NaCl, 130 N-metil-D-glucamina, 2.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 glucosa (pH 7.4 y ajustado con sucrosa a 340 mOsm) donde se trituraron usando una serie de puntas de pipetas de orden decreciente de tamaño. Después de 20 minutos, las neuronas aisladas se adhieren al fondo del pocillo de 35 mm (con o sin vidrio) y están listas para los experimentos electrofisiológicos e inmunocitoquímicos.

## **Western Blot**

**Western blot de tejidos:** Se obtuvieron muestras de tejidos de médula espinal (SC), tronco encefálico (BS), hipocampo (H), cerebelo (CBL) y nucleus accumbens (nAc) para luego ser lisados. Los tejidos fueron pesados y luego lisados con buffer de homogenización (Tris-HCl 10 mM, Sucrosa 0,25 M, MEM 10 mM, Inhibidor de proteasas 1X, pH=7,4), luego fueron sonicados con pulsos de 15 segundos a 90% de amplitud y posteriormente almacenados a -80 °C. Luego de la obtención de las muestras se determinó la concentración de proteínas por el método del ácido bicinónico (Pierce) utilizando BSA como proteína estándar. Los homogenizados fueron sometidos a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS 1X y 0,1% Tween 20 durante una hora en agitación. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios anti-R-Gli  $\alpha$ 1 (1:500, mouse, SySys), anti-GluA1 (1:200, mouse, Santa Cruz), anti-VGluT1 (1:500, mouse, Neuromab), anti-GABA $\alpha$ 1 (1:500, rabbit, SySys), anti-PSD95 (1:500, mouse, Neuromab), anti-Sinaptofisina (1:500, rabbit, Invitrogen), anti-GAD67 (1:500, rabbit, SySys), anti-vGAT (1:200, rabbit, Neuromab) y anti- $\alpha$ -

tubulina (1:3000, mouse, Sigma) por 1-2 hrs. Luego de los lavados con TBS 1X y 0,1% Tween 20, las membranas fueron incubadas por una hora con anticuerpos secundarios anti-mouse o anti-rabbit conjugado a HRP (1:5000, Santa Cruz). La inmunorreactividad de las proteínas fue detectada usando reactivo de quimioluminiscencia (Promega). Los niveles de  $\alpha$ -tubulina fueron utilizados como control de carga. Los Western blot fueron cuantificados con el programa "ImageJ" (NIH) y los resultados graficados y analizados con el programa Microcal Origin 6.0.

**Western Blot desde cultivos de neuronas espinales:** Se lisaron las células espinales de 15 DIV provenientes de cultivos primarios de WT y KI con buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.5 mM, NaCl 140 mM, Triton X-100 0.5% y DTT 100 mM). Las muestras fueron denaturadas en buffer de carga 4X a 95 °C por 10 minutos. Se cargaron cantidades iguales a 60  $\mu$ g de proteínas en geles SDS-PAGE al 10%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V por 90-110 minutos. Luego, se realizó la transferencia de proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, a amperaje constante de 250 mA por 90 minutos. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS y 0,1% Tween 20 durante una hora en agitación. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios anti- R-Gli  $\alpha$ 1 (1:1000, mouse, SySys), anti-GluA1 (1:200, mouse, Santa Cruz), anti-VGluT1 (1:500, mouse, Neuromab), anti-GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 (1:500, rabbit, SySys), anti-PSD95 (1:500, mouse, Neuromab), anti-Sinaptofisina (1:500, rabbit, Invitrogen), anti-GAD67 (1:500, rabbit, SySys), anti-vGAT (1:200, rabbit, Neuromab) y anti- $\alpha$ -tubulina (1:3000, mouse, Sigma) por 1-2 hrs. Luego de

los lavados con TBS 1X y 0,1% Tween 20, las membranas se incubaron por una hora con anticuerpos secundarios anti-mouse o anti-rabbit conjugado a HRP (1:5000, Santa Cruz) dependiendo del anticuerpo primario utilizado. La inmunoreactividad de las proteínas fue detectada usando un reactivo de quimioluminiscencia (Promega). Los niveles de  $\alpha$ -tubulina fueron utilizados como control de carga. Los Western blot fueron cuantificados con el programa "ImageJ" (NIH) y los resultados graficados y analizados con el programa Microcal Origin 6.0.

### **Dot Blot**

Los tejidos (nAc y BS) fueron lisados con un buffer que contiene 0.5 mM EDTA, 140 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, y 100 mM DTT. Cinco micro litros de cantidades iguales de proteínas fueron agregadas a una membrana de nitrocelulosa y dejadas secar por 5-10 minutos. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueadas con leche al 5% e incubadas con el anticuerpo primario anti-GlyT1 (1:200, mouse; Santa Cruz biotechnology). Los puntos inmunoreactivos fueron detectadas con el anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-mouse (1:5000, Santa Cruz biotechnology) y visualizado con el kit ECL Plus Western Blotting Detection System (PerkinElmer, MA, USA)(Peters et al., 2013).

### **Inmunocitoquímica**

**Cultivo de neuronas espinales de ratón:** Se removió el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS 1X (1 ml, pH 7.4). Posteriormente, se incubo con el anticuerpo primario anti-R-Gli  $\alpha_1$  (1:50, mouse, SySys) por 15 min,

para luego fijar las células con 1-2 ml de metanol frío (-20°C) por 3 min. Luego, se lavaron 3 veces con PBS 1x para retirar el fijador. Después se aplicó suero de caballo por 60 min, para bloquear la unión de proteínas inespecíficas, y se incubó toda la noche con anticuerpo primario anti-sinaptofisina (1:200, rabbit, Invitrogen). Al día siguiente se lavó con PBS 1X y se incubó con anticuerpo secundario anti-IgG de mouse y rabbit (Alexafluor 488 y Cy3; Jackson Labs) diluido 1:200, por 2 horas para revelar la interacción con el anticuerpo primario. Tras 5 lavados de 3 minutos con PBS 1X, la preparación fue montada en medio de montaje Dako (Dakocytomation, USA) para observar la fluorescencia emitida en un Microscopio confocal Zeiss LSM700 (Carl Zeiss, Alemania). Todos los anticuerpos fueron preparados con suero de caballo al 5% en PBS 1X. Las imágenes fueron almacenadas y luego se analizaron el número de puntas en procesos primarios y en soma, tamaño de clúster de R-Gli  $\alpha_1$ , intensidad de fluorescencia y co-localización entre R-Gli  $\alpha_1$  y sinaptofisina mediante el programa ImageJ (NIH), para luego realizar análisis estadísticos con el programa Origin 6.0 (Microcal Software Inc).

**Rebanadas coronales de cerebro:** Las rebanadas fueron obtenidas como se describió previamente. Cortes coronales de 120-150  $\mu\text{m}$  conteniendo el nAc fueron fijados con PFA 4% (Bioworld, USA) por 50 min a temperatura ambiente y en agitación. Después de 5 lavados de 10 minutos con PBS 1X, las neuronas fueron bloqueadas y permeabilizadas con suero de caballo (10 %) y Triton X-100 0.3% (Sigma) por 40 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Luego, las rebanadas fueron incubadas por toda la noche (16 hrs) en agitación, en

combinación con los anticuerpos primarios anti-R-Gi  $\alpha$ 1 BT (1:100, mouse, SySys), MAP2 (1:200, rabbit, Santa Cruz biotechnology) y anti-GlyT2 (1:200, goat, Santa Cruz biotechnology). Al día siguiente, las rebanadas fueron lavadas 5 veces por 10 minutos con PBS 1 X e incubadas por 2 horas en agitación con los anticuerpos secundarios anti- mouse, rabbit y goat (Streptavidin Oregon Green, Cy3 y Cy5, Jackson labs, respectivamente) diluidos 1:200. Después de 5 lavados con PBS 1X, las preparaciones fueron montadas con la solución de montaje Dako (DakoCytomation, USA). Las muestras de neuronas accumbales fueron elegidas al azar usando el microscopio confocal Zeiss LSM700 (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron capturadas, almacenadas y analizadas usando el programa ImageJ (NIH).

**Neuronas disociadas de nucleus accumbens:** Las neuronas agudamente disociadas fueron incubadas por 15 min con anticuerpo primario anti-R-Gli  $\alpha$ 1 (1:100, mouse, SySys) y fijadas por 10 min con metanol frío (-20°C). Después de 3 lavados con PBS 1X, las neuronas fueron bloqueadas con suero de caballo (10%) por 30 minutos. Las células fueron incubadas por toda la noche (16 hrs) con anticuerpos primarios anti-sinapsina 1 (1:200, goat, Santa Cruz biotechnology) y G $\beta$  (1:200, rabbit, Santa Cruz biotechnology). Luego, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas por 2 horas con anticuerpos secundarios anti-mouse, goat y rabbit (Alexafluor 488, Cy3 and Alexafluor 647, Jackson Labs, respectivamente) diluido en 1:200. Después de 5 lavados con PBS 1X, las muestras fueron montadas con medio de montaje Dako (DakoCytomation, USA). Las neuronas accumbales fueron elegidas al azar usando el microscopio confocal

Zeiss LSM700 (Carl Zeiss, Germany). Las imágenes fueron capturadas, almacenadas y analizadas usando el programa ImageJ (NIH).

### **PCR convencional**

Para el análisis de PCR, RNA total fue aislado desde tejido de ratones usando el reactivo RNA-solv (Omega Bio-tek, Inc, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Partidores para PCR específicos para R-Gli  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y GlyT2, fueron usados y combinados con partidores de un gen constitutivo como GAPDH. Los partidores usados para la detección de R-Gli  $\alpha 1$  fueron los siguientes: GLYRA1-F 5'-CTG TTT GCC TGC TCT TCG TGT-3' y GLYR A1-R 5'-TGG GGA AAC CGA TGC GAG ATA-3' los cuales generan un producto de 320-350 bp. Para detectar R-Gli  $\alpha 2$ , el partidor forward GLYRA2A-F 5'-ATC AAC AGT TTT GGA TCA GTC A-3' y el partidor reverse GLYRA2-R 5'- CCT TCA GCA ACT TGT ACT GG-3', fueron usados los cuales generan producto de 410 bp. Para R-Gli  $\alpha 3$ , fueron usados los siguientes primer GLYRA3-F 5'-GGG TAC ACA ATG AAT GAT CTC-3' y GLYRA3-R 5'-AGA GAC TTA ATC TTG CTG CTG ATG-3', resultando en productos de aproximadamente 350 o 450 bp, para los splices K y L respectivamente. Finalmente, para GlyT2 los partidores fueron los siguientes mGLYT2-F 5'-CAC CTA GGA CCA GCC CTG A-3' y mGLYT2-R 5'-GGT ATT GTT GTG CTC CAG CG-3', generando un producto de entre 350-400 bp. El cDNA fue sintetizado desde 2  $\mu$ g de muestras de mRNA con el kit Affinity Script QPCR cDNA synthesis (Agilent Technologies). El PCR convencional fue realizado con 2  $\mu$ l of cDNA, 0.2  $\mu$ l de polimerasa Taq DNA (New England Biolabs) y una concentración final de



primers de R-Gli y GlyT2 de 0.2  $\mu$ M por 35 ciclos con 1 minuto de alineamiento a 54 °C y 1 minuto de elongación a 72 °C, usando un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal.

## **Electrofisiología**

Los registros de fijación de voltaje (Voltage clamp) y de corriente (Current clamp) fueron realizados en la configuración “célula completa” (whole cell) y de canal único (single channel), adquiridos con el amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, CA), filtrados a 5 y 1 kHz con el filtro low pass Bessel (whole cell y canal único, respectivamente) y usando una ganancia de 2 para registros de célula completa y de 20 para registros de canal único.

**Corrientes macroscópicas evocadas de glicina:** Registros de neuronas disociadas de nAc, PFC y VTA fueron realizadas usando la técnica de voltaje clamp (Hamill et al., 1981). Las corrientes activadas por glicina fueron estudiadas usando la configuración de célula completa. Las pipetas de patch fueron preparadas desde micropipetas de borosilicato (World Precision Instruments) usando un puller horizontal P-1000 (Sutter Instruments). La resistencia para la configuración célula completa fue de 3-6 M $\Omega$ . Los registros de corrientes evocadas de glicina fueron realizadas usando el amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, CA) a voltaje fijado de -60 mV. Usamos una solución interna que contiene (en mM): 120 CsCl, 4.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 0.5 Na<sub>2</sub>-GTP y 2.0 Na<sub>2</sub>-ATP (pH 7.4, 290-310 mOsmol) la cual fue modificada para experimentos de diálisis intracelular, cambiando 0.5 Na<sub>2</sub>-GTP por el análogo no hidrolizable de

GTP; GTP- $\gamma$ -S (0.5 mM, Sigma). La solución externa usada contiene (en mM) 150 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES (pH 7.4, 315-320 mOsm). Las neuronas fueron perfundidas por concentraciones crecientes de glicina (1-1000  $\mu$ M), para determinar parámetros farmacológicos como EC<sub>50</sub> y EC<sub>10</sub>, este último parámetro fue usado para determinar los efectos de etanol (1-100 mM) y de la activación de la proteína G por la diálisis intracelular de GTP- $\gamma$ -S. Las corrientes fueron mostradas y almacenadas en un computador personal usando el adquirente 1322A Digidata (Axon Instruments, Union City, CA) y analizados con el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA). Finalmente, fueron representadas y analizadas con el programa Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

**Corrientes de canal único evocadas por glicina:** Registros de neuronas disociadas de nAc fueron realizadas usando la técnica de voltaje clamp (Hamill et al., 1981). Las corrientes activadas por glicina fueron estudiadas usando la configuración de canal único out-side out. La resistencia de las pipetas de patch usadas para la configuración para registros de canal único “out-side out” fue de 10-20 M $\Omega$ . Los registros de corrientes evocadas de glicina fueron realizadas usando el amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, CA) a voltaje fijado de -60 mV. Usamos una solución interna que contiene (en mM): 120 CsCl, 4.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 0.5 Na<sub>2</sub>-GTP y 2.0 Na<sub>2</sub>-ATP (pH 7.4, 290-310 mOsmol). La solución externa usada contiene (en mM) 150 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES (pH 7.4, 315-320 mOsm). Las neuronas fueron perfundidas por el equivalente a EC<sub>10</sub> de glicina (15  $\mu$ M), en presencia o

ausencia de etanol (5-10 mM). Las corrientes fueron mostradas y almacenadas en un computador personal usando el adquisidor 1322A Digidata (Axon Instruments, Union City, CA) y analizados con el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA). Finalmente, fueron representadas y analizadas con el programa Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

### **Corrientes sinápticas inhibitorias en miniaturas de glicina (mIPSCs):**

Rebanadas coronales de cerebro (300 – 400  $\mu\text{m}$ ) conteniendo el nucleus accumbens, fueron preparados desde ratones WT, KI y D1-GFP (21-40 días postnatal) como anteriormente se describió (Jun et al., 2011). Luego las rebanadas fueron transferidas a la cámara de registro y perfundidas con aCSF (2-3 ml/min) oxigenado (95%  $\text{O}_2$ /5% $\text{CO}_2$ , RT) a 30-32 °C. Para así, ser observadas con el microscopio Nikon Eclipse FN1 (Japan) equipado con óptica DIC-IR. Registros de rebanadas de nAc fueron realizadas usando la técnica de voltaje clamp (Hamill et al., 1981). La resistencia de las micropipetas para la configuración célula completa fue de 3-6 M $\Omega$ . Los registros de las corrientes de glicina fásicas (mIPSC) fueron realizados usando un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, CA) a fijación de voltaje de -60 mV en presencia de TTX (500nM, Tocris), D-APV (40 $\mu\text{M}$ , Tocris), CNQX (10 $\mu\text{M}$ , Tocris) y bicuculina (10 $\mu\text{M}$ , Sigma). Usamos una solución interna que contiene (en mM): 120 KCl, 4.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 0.5 Na<sub>2</sub>-GTP and 2.0 Na<sub>2</sub>-ATP (pH 7.4, 290-310 mOsmol) y solución aCSF (en mM): 124NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glucosa, 2 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4 and 315-320 mOsm) saturado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Las corrientes fueron registradas y almacenadas en un computador personal usando

un adquisidor 1322A Digidata (Axon Instruments, Union City, CA) y analizadas con el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA). Parámetros de Frecuencia (Hz), constante de decaimiento (ms) y amplitud (pA) de las corrientes sinápticas en miniatura fueron medidas para determinar los efectos de etanol (100 mM) en mIPSCs glicinérgicos usando el programa MiniAnalysis (Synaptosoft Inc. NJ, USA). Finalmente, fueron representadas y analizadas con el programa Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

**Corrientes sinápticas eléctricamente evocadas de glicina (eIPSCs):** Una solución interna de cloruro de potasio que contiene (en mM): 120 KCl, 4.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 0.5 Na<sub>2</sub>-GTP y 2.0 Na<sub>2</sub>-ATP fue usada para registrar los eventos sinápticos mediados por glicina. Un microelectrodo estimulador bipolar (World Precision Instruments, Sarasota, FL) fue puesto en el nAc, cercano al lugar de registro. Pulsos de estimulación fueron realizados con un estimulador aislado a una amplitud de 10  $\mu$ A de intensidad y 0.5 ms de duración, para provocar una corriente submáxima evocada estable. Para evocar eIPSCs glicinérgicos, la rebanada fue perfundida con solución aCSF (saturada con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) conteniendo el antagonista de R-GABA<sub>A</sub>; bicuculina (10  $\mu$ M), antagonista de R-NMDA; D-APV (50  $\mu$ M), y el antagonista de R-AMPA, CNQX (10  $\mu$ M). Corrientes eIPSCs fueron medidas a potencial fijo de -60 mV. Las constantes de decaimiento ( $\tau_1$  y  $\tau_2$ ), Amplitud (pA) y rise time (ms) de las corrientes sinápticas fueron medidas para determinar los efectos de etanol (100 mM) en eIPSCs glicinérgicos usando el programa MiniAnalysis (Synaptosoft Inc. NJ, USA). Finalmente, fueron

representadas y analizadas con el programa Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

**Corrientes tónicas asociadas a R-Gli:** Para evaluar la presencia de corrientes tónicas de glicina, Org24598 (10  $\mu$ M, Tocris), etanol (100 mM, Merck) y estriquina (1  $\mu$ M, Sigma) fueron aplicadas en rebanadas de nAc en configuración de voltage-clamp a voltaje fijo de -60 mV, en presencia de TTX (500nM, Tocris), D-APV (40 $\mu$ M, Tocris), CNQX (10 $\mu$ M, Tocris) y bicuculina (10 $\mu$ M, Sigma). La máxima amplitud de la corriente tónica fue estimada después de 4 minutos de perfusión de Org24598 y estriquina, y de 2 minutos de exposición a etanol. El cambio de corriente fue calculado como el promedio de la corriente durante una sección del registro de mIPSC libre de eventos sinápticos por 30 segundos. Se construyeron histogramas con el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA). Todos los puntos de esos histogramas fueron ajustados con una curva Gaussian. La diferencia entre los peaks de estas curvas Gaussianas en presencia y ausencia de las drogas, fueron calculadas para determinar el cambio en la corriente basal. Finalmente, los gráficos fueron representados y analizados con el programa Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

**Registros de corriente fija (Iclamp):** Para determinar los efectos de etanol (100 mM) y estriquina (1  $\mu$ M) en la generación de espigas de potenciales de acción (AP), registros de current-clamp fueron realizados usando una solución interna de potasio gluconato (en mM): 126 KGluc, 4 KCl, 10 HEPES, 10 BAPTA, 4 NaATP, 0.3 NaGTP, ajustado to 290 mOsm, pH = 7.2). Inyecciones de corrientes de 25-300 pA por 200 ms, fueron usadas para evocar el disparo de potenciales de acción

en neuronas de nAc. Así, la excitabilidad neuronal fue evaluada antes, durante y después de la exposición a etanol y estircnina. Para determinar los efectos de etanol y estircnina en la función del R-Gli, etanol con y sin estircnina fueron agregados a la solución aCSF (saturado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) y perfundidas al baño durante todo el registro. Los registros fueron analizados y se obtuvieron el potencial de reposo de membrana (mV), el potencial de generación de potencial de acción (mV) y la frecuencia (N° de espigas). Finalmente, los datos fueron representados y analizados con el programa Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

### **Estudios de comportamiento**

Ratones machos y hembras WT y KI fueron usados para todos los estudios, a menos que se indique lo contrario. Todos los ratos tuvieron de 8 a 12 semanas de edad al momento de ser testeados.

**LORR. Loss of Righting Reflex:** Para testear los efectos sedativos/hipnóticos de etanol, los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal por 3.5 g/kg de etanol. Luego, los ratones fueron puestos “boca arriba” en camas con forma de v y monitoreados hasta que fueron capaces de pararse por sí mismos 3 veces en un periodo de 30 segundos. LORR fue determinado como el tiempo desde que el ratón es puesto en posición “boca arriba” (efectos sedativos/hipnóticos) hasta que es capaz de ponerse de pie por sí mismo (recuperarse). Los resultados fueron graficados con el programa Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA) y analizados estadísticamente por two-way ANOVA.

**Prueba de consumo libre y voluntario de etanol; Drinking in the dark (DID):**

DID toma la ventaja del periodo circadiano más activo del ratón, proveyendo un límite de 2-4 horas de acceso a etanol. Protocolo tomado desde Blednov et al. (2006). Resumiendo, los animales (macho y hembras) se seleccionaron y se dejaron en cajas individuales con disponibilidad *ad libitum* de agua y comida. Luego se cambió su ciclo de oscuridad de 7:00pm-7:00am a 2:00pm-2:00am. El cambio de horario fue realizado una hora al día y dejados 1 semana para ambientación. Se ocuparon botellas de vidrio de 500 ml con zipper con bola de acero inoxidable. Se preparó solución de etanol al 15% y de sucrosa al 5% y se reemplazaron las botellas de agua por etanol 15% o sucrosa 5% después de 3 hora de ciclo de oscuridad (5:00pm) y luego de 2 horas de exposición libre a las botellas de etanol 15% o sucrosa 5% se volvió a poner agua. Cada botella fue pesada antes y después de cada sesión de consumo (días 1-3). El último día (4) se dejó la botella de etanol 15% o sucrosa 5% por 4 horas y se registró el peso de los animales y de las botellas antes y después de la sesión de consumo (Figura 38a). Los resultados fueron graficados y estadísticamente analizados (two-way ANOVA) por el software Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

**Metabolismo de alcohol:** Los ratones WT y KI usados en DID, al día 4 se extrajo sangre desde la cola (20-100  $\mu$ l) al momento de terminar el test. La Concentración de Alcohol en la Sangre (del inglés Blood Ethanol Concentration; BEC) fueron determinados en sangre total, usando el equipo Analox AM1 Alcohol Analyzer (Lunenburg, MA). BECs fueron graficados y estadísticamente analizados (two-way ANOVA) por el software Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

**Prueba de preferencia, Conditioned Place Preference (CPP):** el aparato consiste en 6 cámaras de condicionamiento de lugar (33x27x20 cm) cada cámara posee una separación por una pared transparente. Cada una de las cámaras está ubicada en un compartimento cerrado, separado, ventilado que atenúa la luz y sonido ambiente. Las cámaras de condicionamiento están compuestas de dos tipos de pisos de acero inoxidable de diferente textura. El piso para el estímulo positivo, se denomina Cs+, y consiste en una grilla de 0.6 cm de largo (Big Grid). Mientras, que el piso para el estímulo negativo (Cs-) fue hecho por una grilla de 0.1 cm de largo (Small grid). El protocolo usado fue previamente descrito por Cunningham et al. (2006). CPP fue realizado en la mañana. Brevemente, se usaron ratones machos, los cuales el primer día fueron manejados y habituados a inyecciones de prueba (500 µl solución salina 0.9%); la pared fue retirada para que el ratón tuviera acceso a explorar libremente la cámara por 10 minutos. 24 horas después del día de habituación, se inició la primera sesión de condicionamiento. Cada ratón fue pesado e inmediatamente inyectado i.p con etanol (2.0 g/kg; días 2, 4, 8 y 10), o con solución salina 0.9% (días 3, 5, 9 y 11). Una vez inyectado los animales fueron puestos por 6 minutos en la cámara de condicionamiento. Los días de inyección de etanol los ratones fueron puestos en el lado de la cámara que posee piso de grilla anchos (Cs+). Mientras, que los días de inyección de vehículo fueron puestos en el lado donde se ubica el piso de grilla pequeña (Cs-). Cada día se registró en video a través de cámaras infrarrojas ubicadas en el aparato. Finalmente, el día 12 se pesaron y luego se inyectaron los ratones con vehículo y se posicionaron los ratones en el centro de la cámara. Se registró la actividad del



ratón por 30 minutos de exploración libre (Figura 39a). Así, los videos del test de preferencia fueron almacenados y analizados usando un software de seguimiento (tracking) Kinovea, en donde se obtuvo el tiempo que paso el ratón en cada piso (mean time on Grid). Los resultados fueron graficados y estadísticamente analizados (two-way ANOVA) por el software Origin 6.0 (Microcal, Inc. Northampton, MA).

### **Soluciones**

Los “stocks” de glicina (Sigma), etanol (Merck), bicuculina (Sigma), CNQX (Tocris), dopamina (Sigma), D-APV (Tocris), TTX (Tocris), estriknina (Sigma) y Org24598 (Tocris) fueron preparados en agua destilada o DMSO, y diluidas en solución aCSF para ser perfundidas directamente a la rebanada o en solución externa para ser perfundidas sobre la neurona disociada.

### **Análisis estadísticos de datos**

A menos que sea indicado, los resultados, incluido los análisis de imágenes, fueron presentados como el promedio  $\pm$  SEM. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando ANOVA (One-way o Two-way) y Tukey test para los estudios de comportamiento. Un nivel de probabilidad (p) menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

## Resultados

### **Objetivo específico 1: Caracterizar la presencia de proteínas sinápticas en distintas regiones del SNC de ratones WT y KI.**

La generación de ratones transgénicos con mutaciones específicas (Knock In; KI) en diversas proteínas, han sido de importancia para entender la función fisiológica o fisiopatológica de la proteína en estudio. La principal ventaja de los animales KI, radica en la posibilidad de evaluar el funcionamiento de la proteína mutada en un sistema biológico *in vivo*, pero el principal desafío es obtener una mutación que sea silente, es decir, que no afecte la expresión de otras proteínas que pueden variar el comportamiento normal del animal.

En nuestro modelo de estudio, se desconoce si la mutación en los aminoácidos KK385-386 pueda generar algún en el comportamiento general del ratón. Como primer test se evaluó, si tanto ratones WT y KI poseen el reflejo de estiramiento de extremidades traseras en ratones. Este test, evaluó el movimiento reflejo mediado por neuronas motoras, las cuales expresan R-Gli  $\alpha 1$ , por lo que una función anormal de R-Gli  $\alpha 1$  en estas neuronas se verá reflejado en el test (Aguayo et al., 2014). Así, se muestra que ratones WT y KI no poseen diferencias en el tono muscular y además, en el ratón KI no se observa ningún tipo de alteración relacionada con la función motora e inhibitoria relacionada con deficiencias de función del R-Gli  $\alpha 1$ , como ha sido demostrado previamente (Findlay et al., 2005; Findlay et al., 2003). Estos datos complementados con los test de comportamientos de respuesta de sobresalto publicados recientemente

(Aguayo et al., 2014), demuestran que el ratón KI es un animal de comportamiento normal, el cual tiene una fertilidad, sobrevivencia y desarrollo totalmente común (Aguayo et al., 2014). Es por ello, que el siguiente paso fue evaluar los niveles de proteínas sinápticas del ratón KI y comparar su expresión con tejidos obtenidos de ratones WT.

### **1.1 Niveles de proteínas sinápticas en tejidos neuronales de ratones WT y KI**

Se evaluaron proteínas sinápticas relacionadas con el mantenimiento del balance excitatorio/inhibitorio del sistema nervioso central en varias regiones. Las proteínas sinápticas evaluadas fueron las siguientes: Sinaptofisina; glicoproteína presente en las vesículas sinápticas, vGAT 1; transportador vesicular de GABA, presente en pre sinapsis inhibitorias, GAD 67; enzima responsable de sintetizar GABA desde glutamato, vGLUT 1; transportador vesicular de glutamato, presente en pre sinapsis excitatoria, GluA1; subunidad del receptor de AMPA, PSD 95; proteína de anclaje que interacciona principalmente con receptores de NMDA y  $\alpha 1$  R-GABA<sub>A</sub>; subunidad del receptor de GABA de tipo A.

**1.1.1 Médula espinal:** La primera región evaluada fue la médula espinal, en donde se expresa en gran densidad el R-Gli  $\alpha 1$  y posee una importante función en la coordinación motora. No se observaron diferencias en los niveles relativos, con respecto a  $\alpha$ -tubulina, de proteínas sinápticas en médula espinal entre ratones WT y KI (Figura 5b) (Tabla 2).

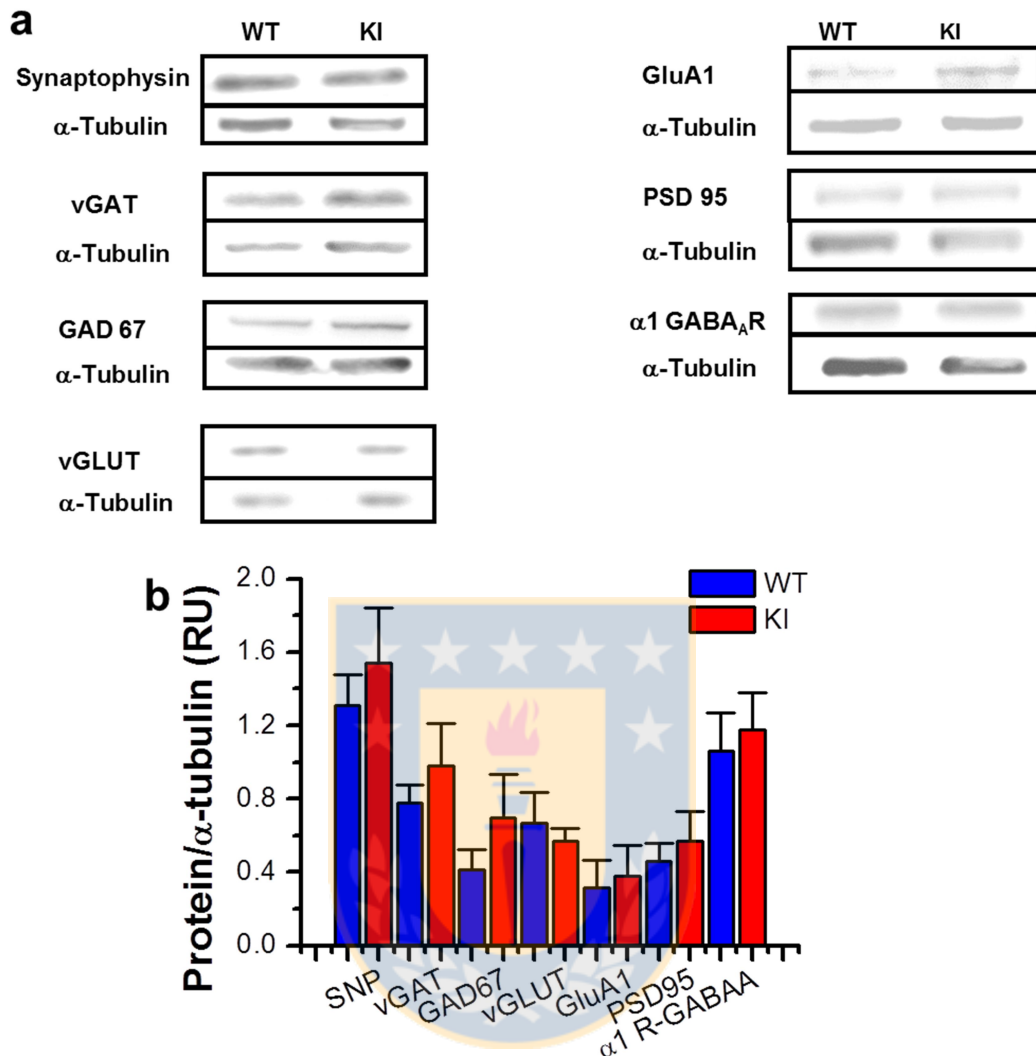
**1.1.2 Tronco encefálico:** El tronco encefálico cumple una importante función fisiológica en el control de la respiración, masticación y regulación del ritmo cardiaco, además en este tejido el R-Gli  $\alpha 1$  es abundante (Liu and Wong-Riley, 2013; Schmid et al., 1991). Los datos obtenidos muestran que los niveles relativos de expresión de Sinaptofisina, vGAT, GAD 67, vGLUT, GluA1, PSD 95 y  $\alpha 1$  R-GABA<sub>A</sub> no difieren significativamente entre WT y KI (Figura 6a y b) (Tabla 2).

**1.1.3 Hipocampo:** El hipocampo es una región del cerebro relacionada con la capacidad de aprendizaje y memoria (Spiers and Bendor, 2014). Es por ello, que cambios en proteínas sinápticas podrían afectar al desarrollo cognitivo del animal. Los datos no mostraron diferencias en las proteínas sinápticas: Sinaptofisina, vGAT, GAD 67, vGLUT, GluA1, PSD 95 y  $\alpha 1$  R-GABA<sub>A</sub> entre ratones WT y KI (Figura 7a y b) (Tabla 2).

**1.1.4 Cerebelo:** Esta región es importante para el control motor, equilibrio, la coordinación del movimiento y el aprendizaje motor (Glickstein and Doron, 2008). Un deterioro en esta región podría conllevar deficiencias motoras en los cuales podría estar envuelto receptores inhibitorios como glicina y GABA (Kayakabe et al., 2013). El análisis de niveles de expresión relativos de Sinaptofisina, vGAT, GluA1, PSD 95 y  $\alpha 1$  R-GABA<sub>A</sub> no mostraron diferencias significativas entre WT y KI (Figura 8a y b) (Tabla 2). Sin embargo, GAD 67 mostró un aumento significativo en los niveles relativos de proteínas en tejido KI cuando se compararon con WT (\* $p < 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 8a y b) (Tabla 2). Interesantemente, los niveles de expresión relativos de vGLUT en el ratón KI

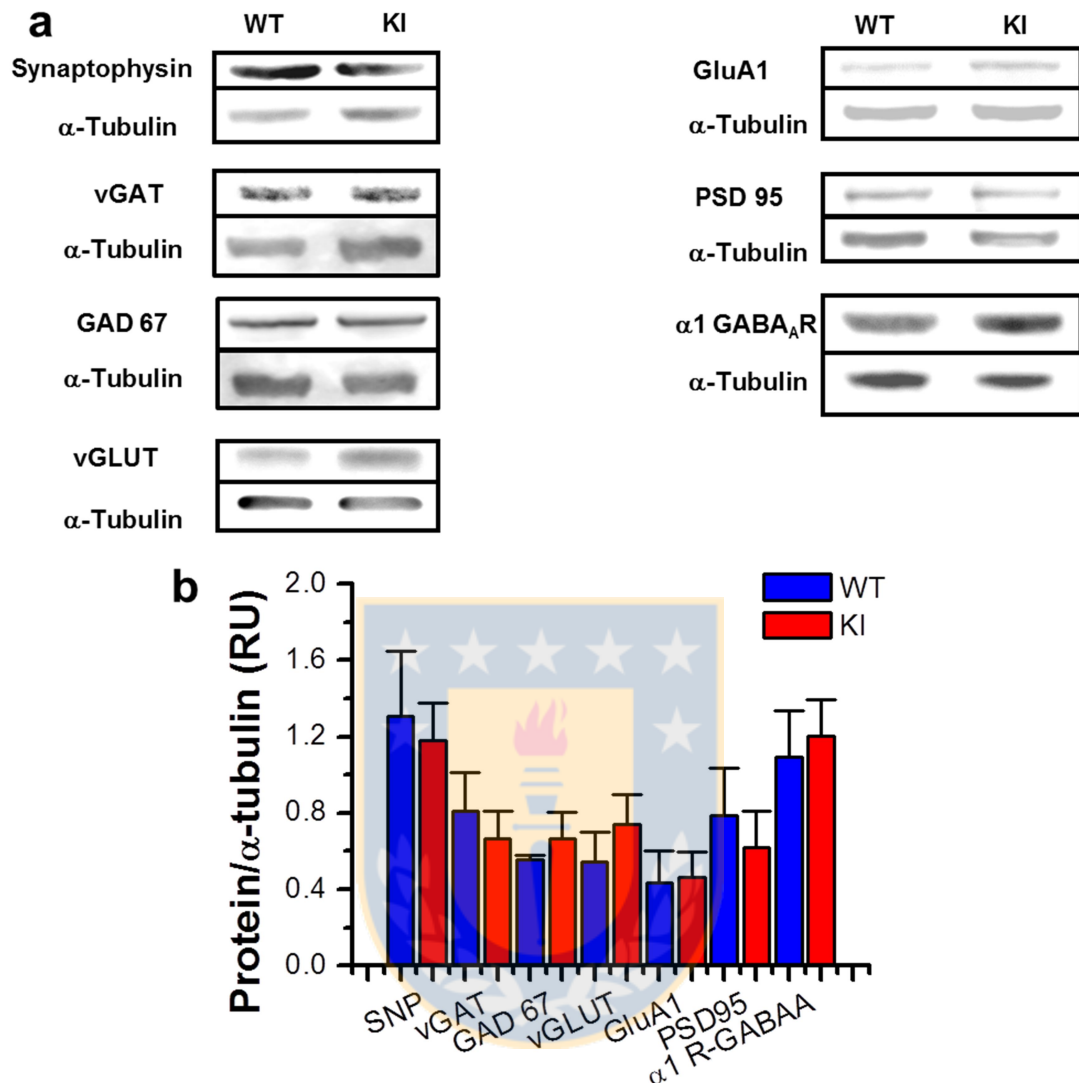
fueron significativamente mayores a los niveles de WT (\*\* $p < 0.01$ , One-way ANOVA) (Figura 8a y c) (Tabla 1). Estos hallazgos, podrían ser explicados por la introducción de la mutación en R-Gli  $\alpha 1$ , debido a que este tejido es importante para la mantención de la función motora (Glickstein and Doron, 2008).





**Figura 4. Proteínas sinápticas en médula espinal.**

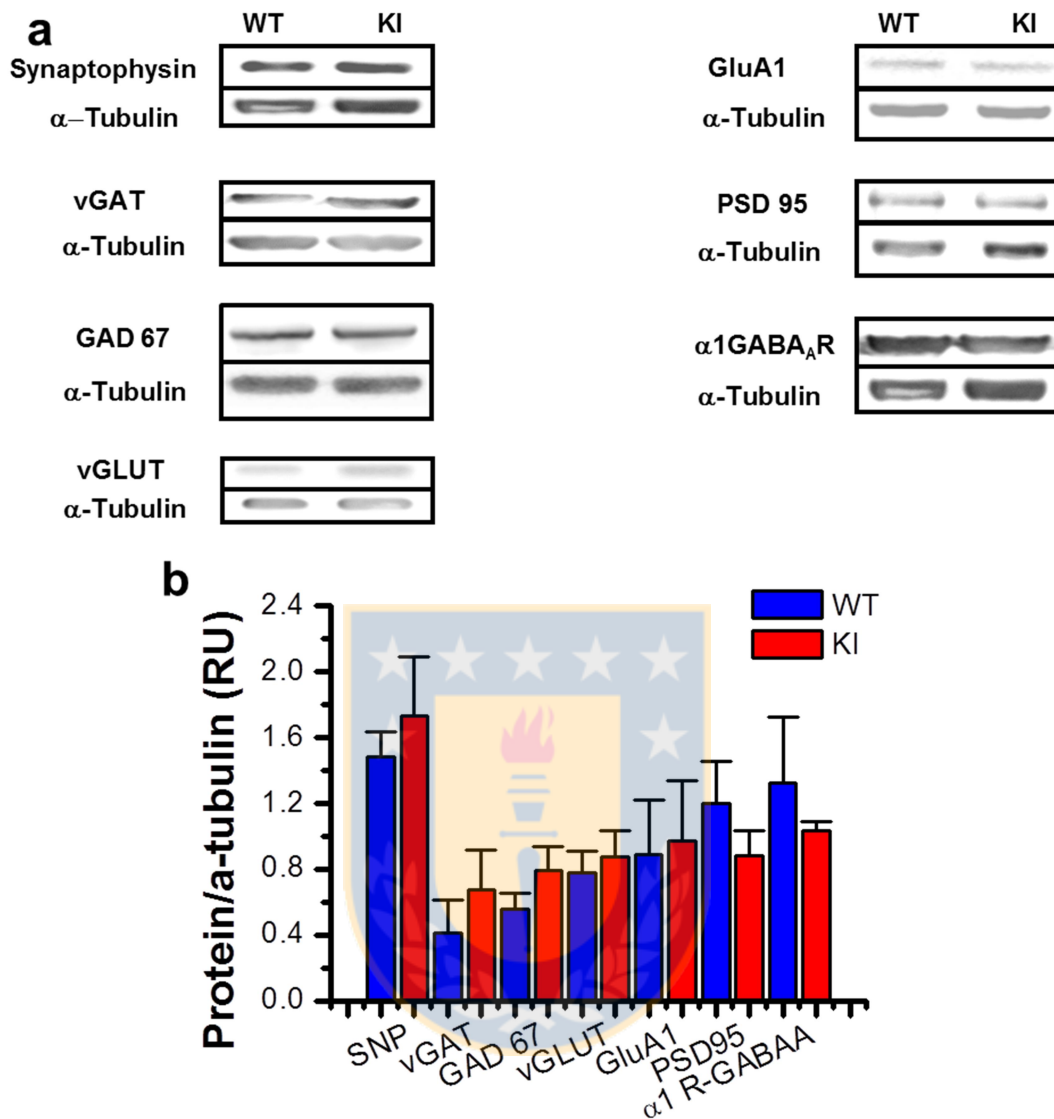
**a)** Western blot de tejidos de médula espinal de ratones WT y KI (21-40 días postnatal) para las proteínas sinápticas sinaptofisina, vGAT, GAD 67, vGLUT, GLUA1, PSD95 y  $\alpha$ 1 R-GABA<sub>A</sub> usando como control de carga  $\alpha$ -tubulina. **b)** Gráficos muestran la cuantificación de los niveles relativos de proteínas en médula espinal de ratones WT (azul) y KI (rojo), no mostrando diferencias significativas. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM (n=4-8 animales). ns  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA.



**Figura 5. Proteínas sinápticas en tronco encefálico.**

**a)** Western blot de tejidos de tronco encefálico de ratones WT y KI (21-40 días postnatal), para las proteínas pre sinápticas sinaptofisina, vGAT, GAD 67, vGLUT, GluA1, PSD95 y  $\alpha$ 1 R-GABA<sub>A</sub>, usando como control de carga  $\alpha$ -tubulina.

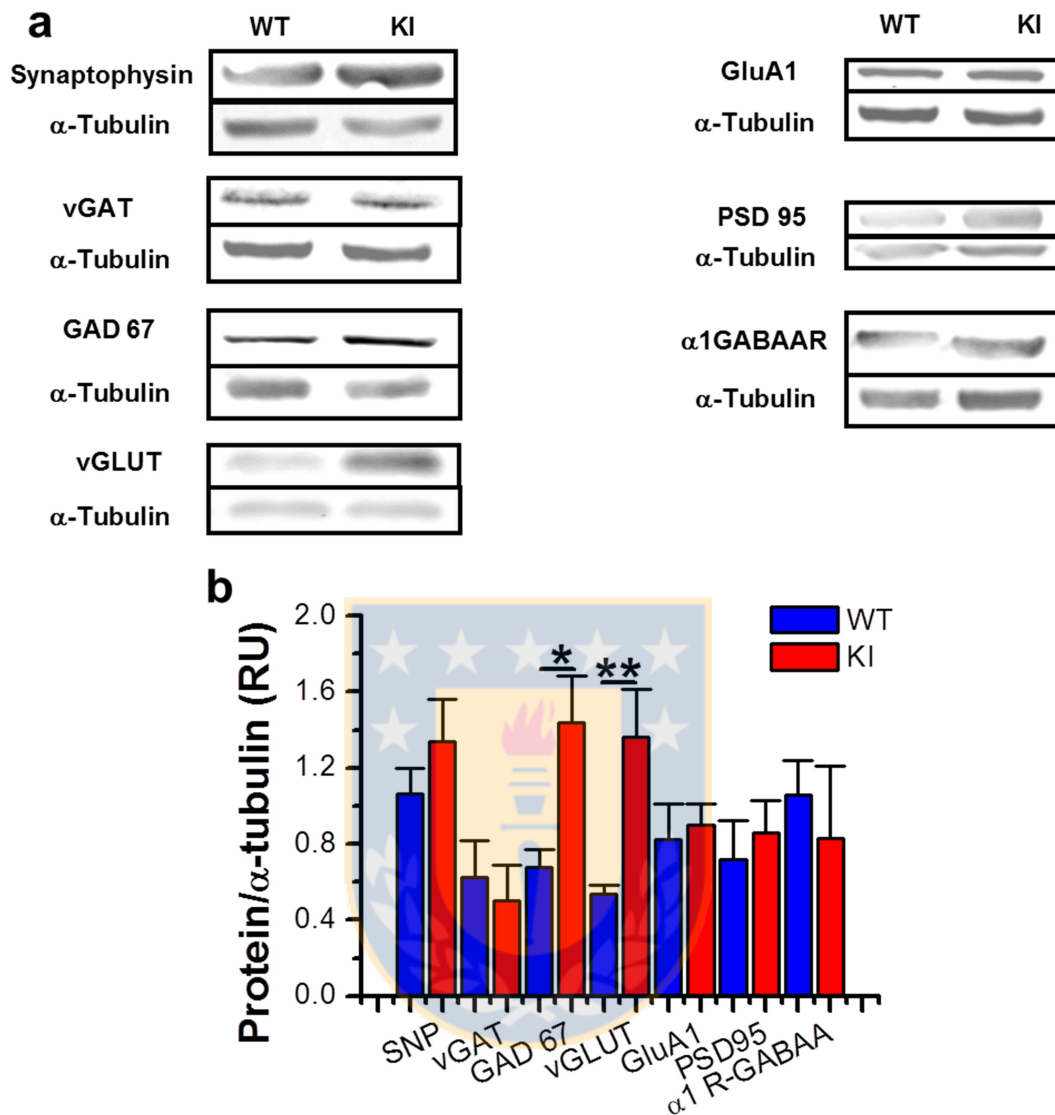
**b)** Gráficos muestran la cuantificación de los niveles relativo de proteínas en tronco encefálico de ratones WT (azul) y KI (rojo), no mostrando diferencias significativas. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM (n=4-8 animales). ns  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA.



**Figura 6. Proteínas sinápticas en hipocampo.**

**a)** Western blot de tejidos de hipocampo de ratones WT y KI, para las proteínas pre sinápticas sinaptofisina, vGAT, GAD 67, vGLUT, GluA1, PSD95 y  $\alpha$ 1 R-GABA<sub>A</sub>, usando como control de carga  $\alpha$ -tubulina. **b)** Gráficos muestran la cuantificación de los niveles relativos de proteínas en hipocampo de ratones WT (azul) y KI (rojo), no mostrando diferencias significativas. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM (n=4-8 animales). ns p>0.05, One-Way ANOVA.



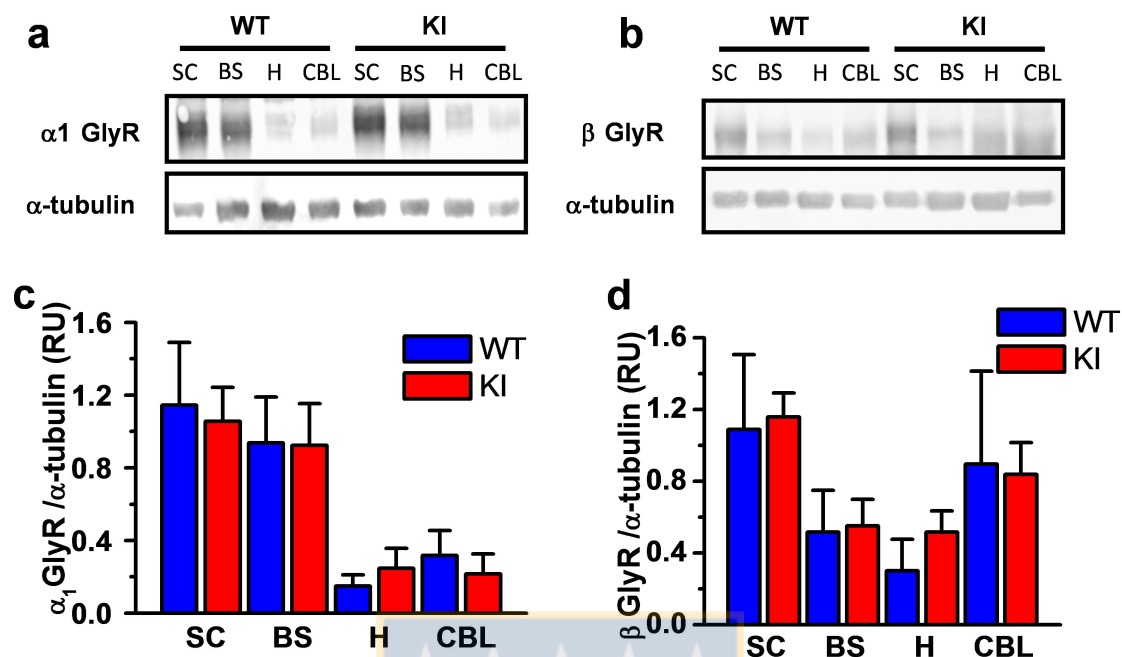


**Figura 7. Proteínas sinápticas en cerebelo.**

**a)** Western blot de cerebelo de ratones WT y KI, para las proteínas sinaptofisina, vGAT, GAD 67, vGLUT, GluA1, PSD95 y  $\alpha$ 1 R-GABA<sub>A</sub>, usando como control de carga  $\alpha$ -tubulina. **c)** Gráficos muestran la cuantificación de los niveles relativos de proteínas en cerebelo de ratones WT (azul) y KI (rojo). Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM (n=4-8 animales). \*p<0.05, \*\*p<0.01, One-way ANOVA.

### 1.1.5 Subunidades $\alpha 1$ y $\beta$ del receptor de glicina en regiones del SNC en

**ratones WT y KI:** La evaluación de los niveles de R-Gli  $\alpha 1$  en ratones WT y KI, fue de importancia para conocer si la mutación introducida en animales KI causó una alteración de la expresión de esta subunidad, así como de la subunidad  $\beta$ , la cual participa en el anclaje del receptor a la post sinapsis, a través de interacciones entre la S346 del LI con la proteína gefirina (Bedet et al., 2006; Maric et al., 2011; Specht et al., 2011). Los datos obtenidos mostraron niveles relativos similares de R-Gli  $\alpha 1$  en WT y KI para médula espinal, tronco encefálico, hipocampo y cerebelo (Figura 8a y c) (Tabla 2). De igual manera, en los niveles relativos de R-Gli  $\beta$ , no se observaron diferencias entre los tejidos neuronales evaluados (Figura 8b y d) (Tabla 2). Es importante señalar que se encontraron altos niveles de R-Gli  $\alpha 1$  en médula espinal y tronco encefálico, mientras que niveles medios en cerebelo y bajos en hipocampo (Figura 8c). Por otro lado, R-Gli  $\beta$  fue encontrado relativamente de forma más homogénea en todos los tejidos (Figura 8d).



**Figura 8. Subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  del receptor de glicina.**

**a)** Western blot para subunidad  $\alpha_1$  de R-Gli en varias regiones del SNC de ratones WT y KI, se evaluaron médula espinal (SC), tronco encefálico (BS), hipocampo (H) y cerebelo (CBL). **b)** Western blot para subunidad  $\beta$  de R-Gli en tejidos de cerebro de ratones WT y KI, se evaluaron médula espinal (SC), tronco encefálico (BS), hipocampo (H) y cerebelo (CBL). **c)** Gráfico muestra la cuantificación de los niveles relativos de R-Gli  $\alpha_1$  en distintas regiones del SNC de ratones WT (azul) y KI (rojo). **d)** Gráfico muestra la cuantificación de los niveles relativos de R-Gli  $\beta$  en distintas regiones del SNC de ratones WT (azul) y KI (rojo). Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM (WT: n=6 y KI: n=3, animales). ns  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA.

**TABLA 2. Resumen de niveles relativos de proteínas sinápticas en diferentes tejidos neuronales de ratones WT y KI**

	Medula espinal (RU)		Tronco encefálico (RU)		Hipocampo (RU)		Cerebelo (RU)	
	WT	KI	WT	KI	WT	KI	WT	KI
<b>Sinaptofisina</b>	1.31 ± 0.2 (8)	1.54 ± 0.3 (8)	1.31 ± 0.4 (8)	1.18 ± 0.2 (8)	1.48 ± 0.1 (8)	1.72 ± 0.4 (8)	1.06 ± 0.1 (8)	1.34 ± 0.2 (8)
<b>vGAT</b>	0.78 ± 0.1 (4)	0.98 ± 0.2 (4)	0.81 ± 0.2 (4)	0.66 ± 0.2 (4)	0.41 ± 0.2 (4)	0.67 ± 0.2 (4)	0.63 ± 0.2 (4)	0.50 ± 0.2 (4)
<b>GAD 67</b>	0.41 ± 0.1 (4)	0.70 ± 0.2 (4)	0.55 ± 0.03 (4)	0.66 ± 0.14 (4)	0.55 ± 0.1 (4)	0.78 ± 0.1 (4)	0.68 ± 0.1 (4)	1.44 ± 0.2 (4) *
<b>vGLUT</b>	0.67 ± 0.2 (8)	0.57 ± 0.1 (8)	0.54 ± 0.2 (8)	0.74 ± 0.2 (8)	0.77 ± 0.1 (8)	0.87 ± 0.2 (8)	0.54 ± 0.1 (8)	1.36 ± 0.3 (8) **
<b>GLUR1</b>	0.32 ± 0.2 (4)	0.38 ± 0.2 (4)	0.43 ± 0.2 (4)	0.46 ± 0.1 (4)	0.88 ± 0.3 (4)	0.97 ± 0.4 (4)	0.82 ± 0.2 (4)	0.9 ± 0.1 (4)
<b>PSD95</b>	0.46 ± 0.1 (8)	0.57 ± 0.2 (8)	0.79 ± 0.2 (8)	0.62 ± 0.2 (8)	1.19 ± 0.3 (8)	0.88 ± 0.1 (8)	0.72 ± 0.2 (8)	0.86 ± 0.2 (8)
<b>α1 R-GABA<sub>A</sub></b>	1.1 ± 0.2 (4)	1.2 ± 0.2 (4)	1.09 ± 0.2 (4)	1.20 ± 0.2 (4)	1.32 ± 0.4 (4)	1.03 ± 0.1 (4)	1.06 ± 0.2 (4)	0.83 ± 0.4 (4)
<b>α1 R-Gli</b>	1.15 ± 0.3 (6)	1.05 ± 0.2 (6)	0.94 ± 0.3 (6)	0.92 ± 0.2 (6)	0.15 ± 0.1 (6)	0.25 ± 0.1 (6)	0.32 ± 0.1 (6)	0.22 ± 0.1 (6)
<b>β R-Gli</b>	1.1 ± 0.4 (4)	1.16 ± 0.1 (4)	0.52 ± 0.2 (4)	0.55 ± 0.2 (4)	0.3 ± 0.2 (4)	0.52 ± 0.1 (4)	0.89 ± 0.5 (4)	0.84 ± 0.2 (4)

Los valores representan el promedio ± SEM.

RU: Unidades relativas en comparación a α-tubulina

En paréntesis el número de animales (n)

\*p<0.05, \*\*p<0.01, One-Way ANOVA

## 1.2 Niveles relativos de proteínas sinápticas en cultivo de neuronas espinales de 15 DIV en ratones WT y KI

Los cultivos de neuronas primarias espinales, son una buena aproximación para evaluar las corrientes macroscópicas y sinápticas de glicina debido a la alta expresión de receptores de glicina endógenos conformados por la subunidad  $\alpha 1$ . Por lo tanto, evaluamos los niveles relativos de proteínas sinápticas en cultivos espinales de 15 DIV. Demostrando que la mutación introducida no afectó los niveles relativos de proteínas sinápticas en cultivo de neuronas espinales (Figura 9) (Tabla 3). Interessantemente, estos datos se correlacionaron con los datos obtenidos previamente en tejido de médula espinal (Figura 4 y 8) (Tabla 2 y 3) y sugirió que la mutación introducida en el animal no altera la expresión del receptor de glicina en neuronas espinales. Por lo tanto, el siguiente paso, fue cuantificar la cantidad y la ubicación de clúster o agrupaciones R-Gli  $\alpha 1$  en la neurona espinal de 15 DIV, ya que diferencias a ese nivel modificarían el patrón de inhibición de la red en la médula espinal.

**TABLA 3. Resumen de niveles relativos de proteínas sinápticas en cultivo de neuronas espinales de ratón WT y KI**

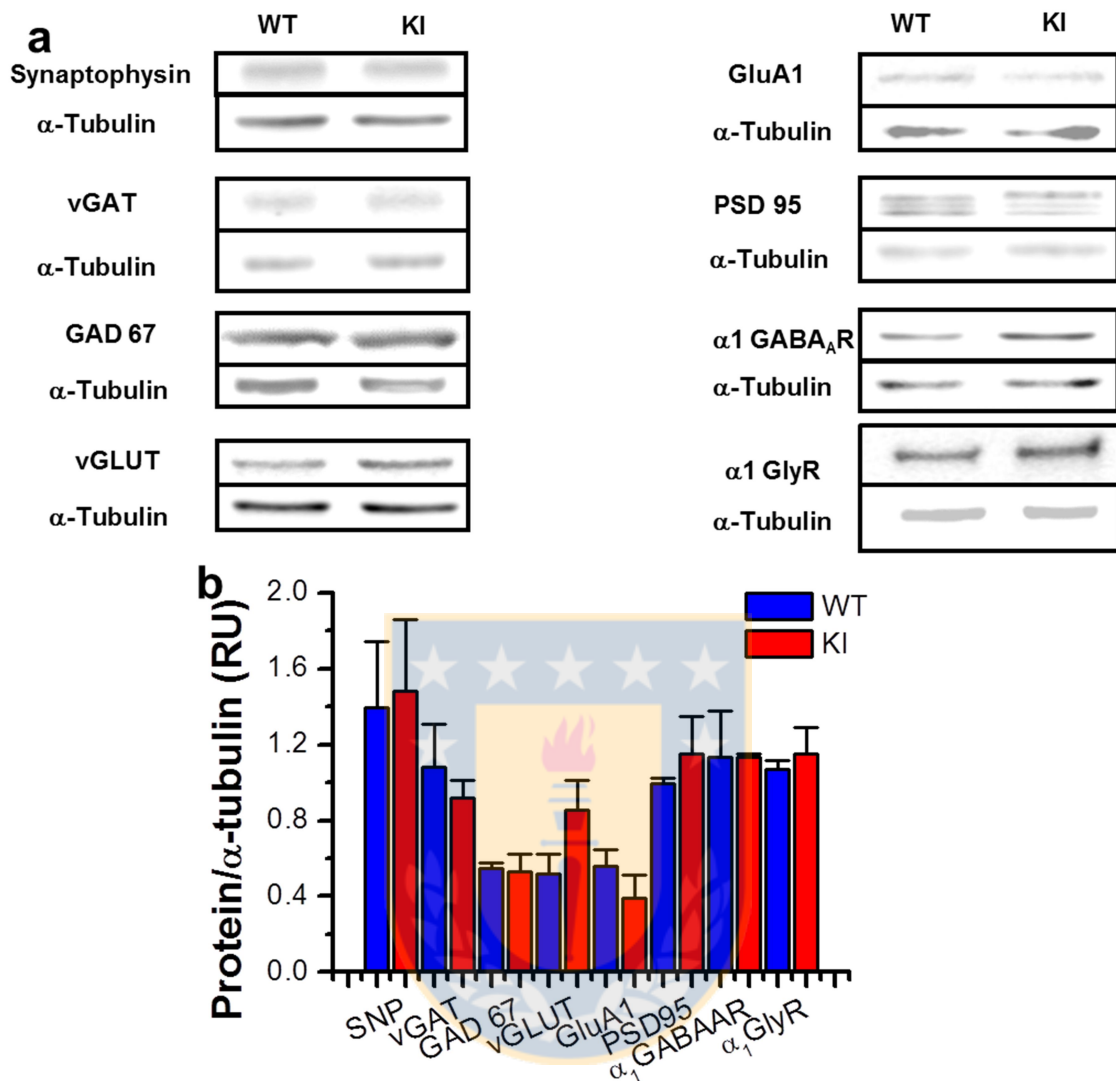
Cultivo primario de médula espinal (RU)					
	WT	KI		WT	KI
<b>Sinaptofisina</b>	1.39 ± 0.4 (5)	1.48 ± 0.4 (5)	<b>GLUR1</b>	0.56 ± 0.1 (5)	0.39 ± 0.1 (5)
<b>vGAT</b>	1.08 ± 0.2 (3)	0.92 ± 0.1 (3)	<b>PSD95</b>	0.99 ± 0.03 (5)	1.15 ± 0.2 (5)
<b>GAD 67</b>	0.55 ± 0.03 (3)	0.53 ± 0.09 (3)	<b><math>\alpha 1</math> R-GABAA</b>	1.14 ± 0.2 (3)	1.13 ± 0.02 (3)
<b>vGLUT</b>	0.52 ± 0.1 (5)	0.86 ± 0.2 (5)	<b><math>\alpha 1</math> R-Gli</b>	1.07 ± 0.04 (3)	1.15 ± 0.1 (3)

Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM.

RU: Unidades relativas en comparación a  $\alpha$ -tubulina

En paréntesis el número de cultivos (n).

Datos no significativos  $p > 0.05$  One-Way ANOVA



**Figura 9. Proteínas sinápticas en neuronas espinales en cultivo de 15 DIV.**

**a)** Western blot de cultivo primario de neuronas espinales de ratones WT y KI, para las proteínas sinápticas: sinaptofisina, vGAT, GAD 67, vGLUT, GluA1, PSD95,  $\alpha$ 1 R-GABA<sub>A</sub> y R-Gli  $\alpha$ 1 usando como control de carga  $\alpha$ -tubulina. **b)** El gráfico muestra la cuantificación de los niveles relativos de proteínas en cultivo de neuronas espinales de ratones WT (azul) y KI (rojo). Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM (n=3-5 cultivos). ns p>0.05, One-Way ANOVA

### 1.3 Agrupaciones de R-Gli $\alpha$ 1 en cultivos de neuronas espinales de 15 DIV en ratones WT y KI

Estudios previos de microscopia, demuestran que R-Gli  $\alpha$ 1 no se distribuyen homogéneamente en la membrana plasmática, sino que lo hace en agrupaciones que aumentan la eficacia de la transmisión inhibitoria (Mariqueo et al., 2014; van Zundert et al., 2004). Específicamente, los receptores de glicina se pueden encontrar en posiciones sinápticas, responsables de las corrientes fásicas inhibitorias, o en no sinápticas, participando de la inhibición tónica de la red neuronal (Eichler et al., 2008; Maguire et al., 2014; Mariqueo et al., 2014; Salling and Harrison, 2014). Una buena aproximación para evaluar la presencia de receptores sinápticos o no sinápticos en la neurona, es a través de inmunocitoquímica. Con el uso de microscopía confocal, en cultivos espinales de 15 DIV, fue posible observar que existen receptores sinápticos, tanto en neuronas espinales WT y KI, que se aposicionaron con sinaptofisina y se detectaron en color amarillo (flecha, Figura 10a) y no sinápticos que se encontraron en agrupaciones aisladas y se observaron de color verde (cabeza de flecha, Figura 10a). Además, encontramos que el número de puntas de R-Gli  $\alpha$ 1 presentes en el soma no varió significativamente entre neuronas WT ( $30 \pm 10$ ; n=7) y KI ( $23 \pm 4$ ; n=7) (Figura 10b), ni tampoco en procesos primarios (WT:  $14 \pm 5$ ; n=7 y KI:  $14 \pm 4$ ; n=7) (Figura 10c). La intensidad de fluorescencia de R-Gli  $\alpha$ 1 para neuronas espinales WT y KI fue de  $52 \pm 2$  RU y  $70 \pm 3$  RU, respectivamente (Figura 10d). Por último, el tamaño de los clúster de R-Gli  $\alpha$ 1 fueron similares (Figura 10e). El valor para espinales WT fue de  $0.60 \pm 0.03 \mu\text{m}$  y

de  $0.62 \pm 0.02 \mu\text{m}$  para KI (Figura 10e). Además, se mostró similares propiedades electrofisiológicas en cultivos de médula espinal de WT y KI (Aguayo et al., 2014). Por lo tanto, estos datos sugieren que la mutación no afectó la expresión, distribución y función de estos receptores inhibitorios.





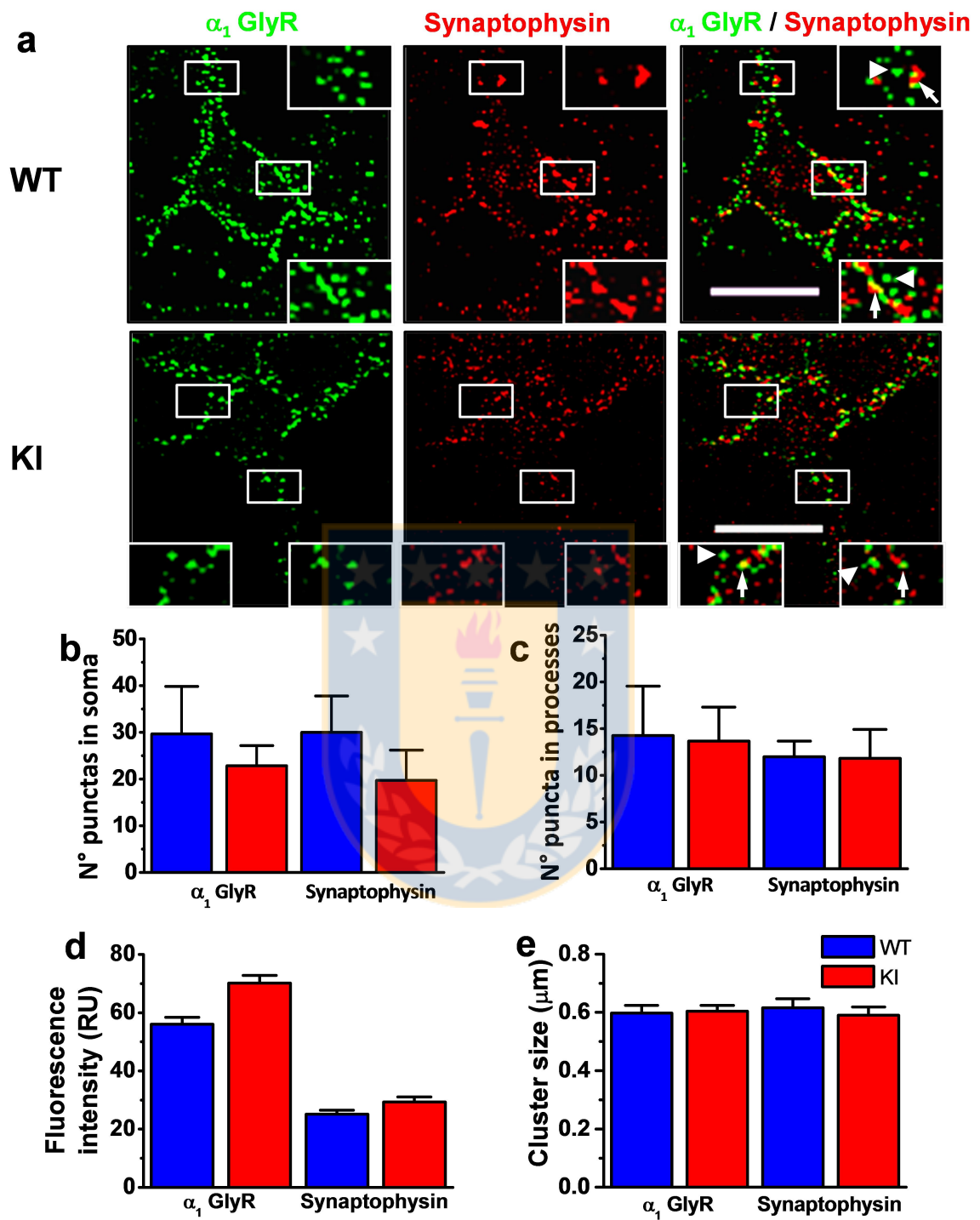


Figura 10. Presencia de R-Gli  $\alpha_1$  en cultivo de neuronas espinales de 15 DIV.

a) Microfotografías confocales de un plano central de la neurona, en las cuales se observa la detección de clúster de R-Gli  $\alpha_1$  (verde) y sinaptofisina (rojo). Se

observa la presencia de clúster de tamaños similares en neuronas espinales WT y KI especialmente en la membrana neuronal y en procesos primarios. Además se muestra la aposición de R-Gli  $\alpha 1$  con sinaptofisina (recuadros), sugiriendo la presencia de receptores sinápticos (flecha) y de R-Gli  $\alpha 1$  no localizados con sinaptofisina que corresponderían a receptores no sinápticos (cabeza de flecha). Barra de calibración corresponde a 15  $\mu\text{m}$ . **b)** Gráfico muestra la cuantificación de puntas somáticas de R-Gli  $\alpha 1$  y sinaptofisina en neuronas espinales WT (azul) y KI (roja). **c)** Gráfico muestra la cuantificación de puntas en procesos primarios de 12  $\mu\text{m}$  de largo de R-Gli  $\alpha 1$  y sinaptofisina en neuronas espinales WT y KI. **d)** Gráfico muestra la intensidad de fluorescencia del marcaje inmunorreactivo de las proteínas R-Gli  $\alpha 1$  y sinaptofisina. **e)** Gráfico muestra el análisis del tamaño de los clústeres de R-Gli  $\alpha 1$  y sinaptofisina para neuronas WT y KI. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM (n=7 desde 3 cultivos diferentes).

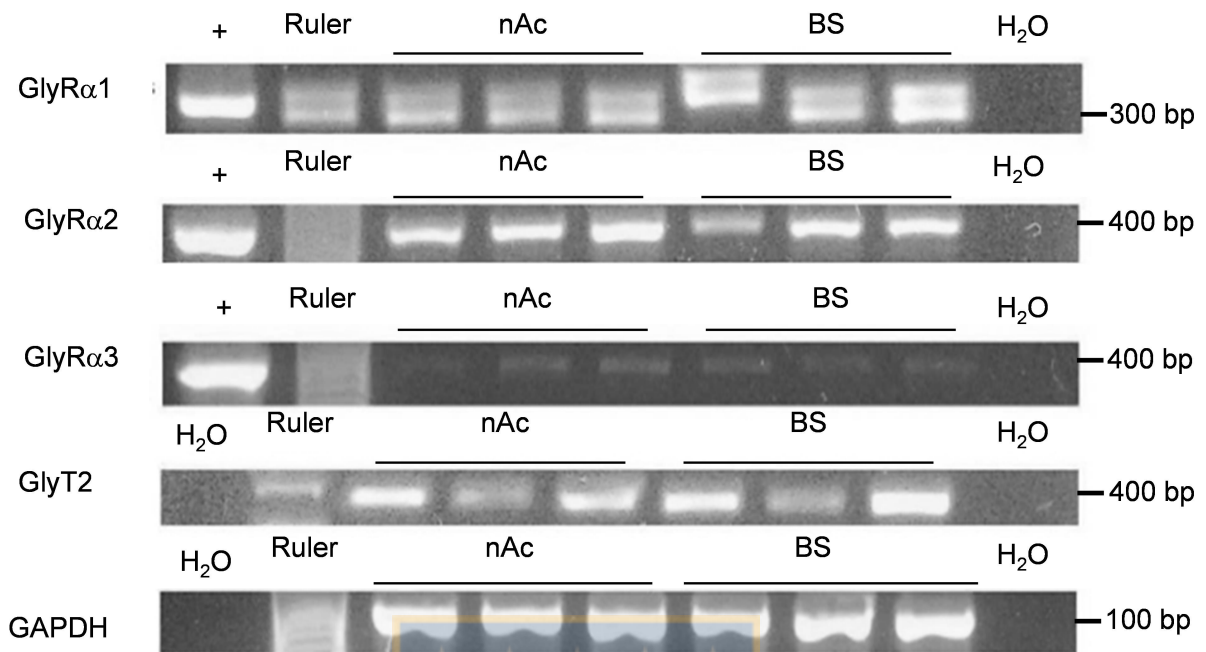
**Objetivo específico 2: Caracterizar la presencia de R-Gli en nAc y determinar las propiedades electrofisiológicas del R-Gli  $\alpha$ 1 en neuronas disociadas y en rebanadas de tejido del nAc, PFC y VTA de ratones WT, KI y D1-GFP.**

El nucleus accumbens forma parte del sistema mesolímbico dopaminérgico y es importante para el refuerzo a estímulos vitales, como beber agua y copulación y no vitales, como drogas y alcohol (Kelley and Berridge, 2002). Se ubica en la zona ventralfrontal del cerebro de ratón, siendo separado en dos estructuras, el core (nAcc) y el shell (nAcsh) y rodea la comisura anterior (aca) (Russo and Nestler, 2013). Es por ello, que la presencia del receptor de glicina en esta área, sugeriría un rol en el desarrollo de procesos adictivos y consumo de etanol. Datos recientes sugieren que R-Gli tiene una función importante en la regulación de la liberación de dopamina en el nucleus accumbens, lo que estaría a su vez, regulando tanto el consumo, como la preferencia a alcohol (Blednov et al., 2015; Li et al., 2012). Por ello, que fue importante determinar la presencia de R-Gli  $\alpha$ 1 y los transportadores de glicina (GlyT1 y GlyT2) en nucleus accumbens, para así determinar si estos receptores son funcionales, forman parte de la red mesolímbica dopaminérgica y son sensibles a los efectos de etanol.

## **2.1 Niveles de mRNA y proteínas glicinérgicas (R-Gli y GlyT) en nucleus accumbens.**

### **2.1.1 Niveles de mRNA para proteínas glicinérgicas en nucleus accumbens:**

Como se detalló anteriormente, existen numerosas evidencias de la presencia de R-Gli en nucleus accumbens (Molander et al., 2007; Molander et al., 2005; Molander and Söderpalm, 2005a, b), pero no se ha determinado la expresión de las distintas subunidades de R-Gli y del transportador de glicina neuronal, este último es fundamental para el mantenimiento de los niveles de glicina y recaptación de esta en la pre sinapsis. Es por ello, que utilizando la técnica de PCR convencional, se analizó la expresión de las subunidades del receptor de glicina:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , más la del transportador de glicina neuronal (GlyT2). Se encontró la presencia de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  (Figura 11). Se usaron como controles positivos los vectores de expresión para las subunidades evaluadas. Interesantemente, también se observó la expresión de mRNA de GlyT2 (Figura 11). Por lo tanto, la presencia de mRNA para las distintas subunidades y transportador de glicina de tipo 2, sugirió la posible presencia de sinapsis glicinérgica en nucleus accumbens.

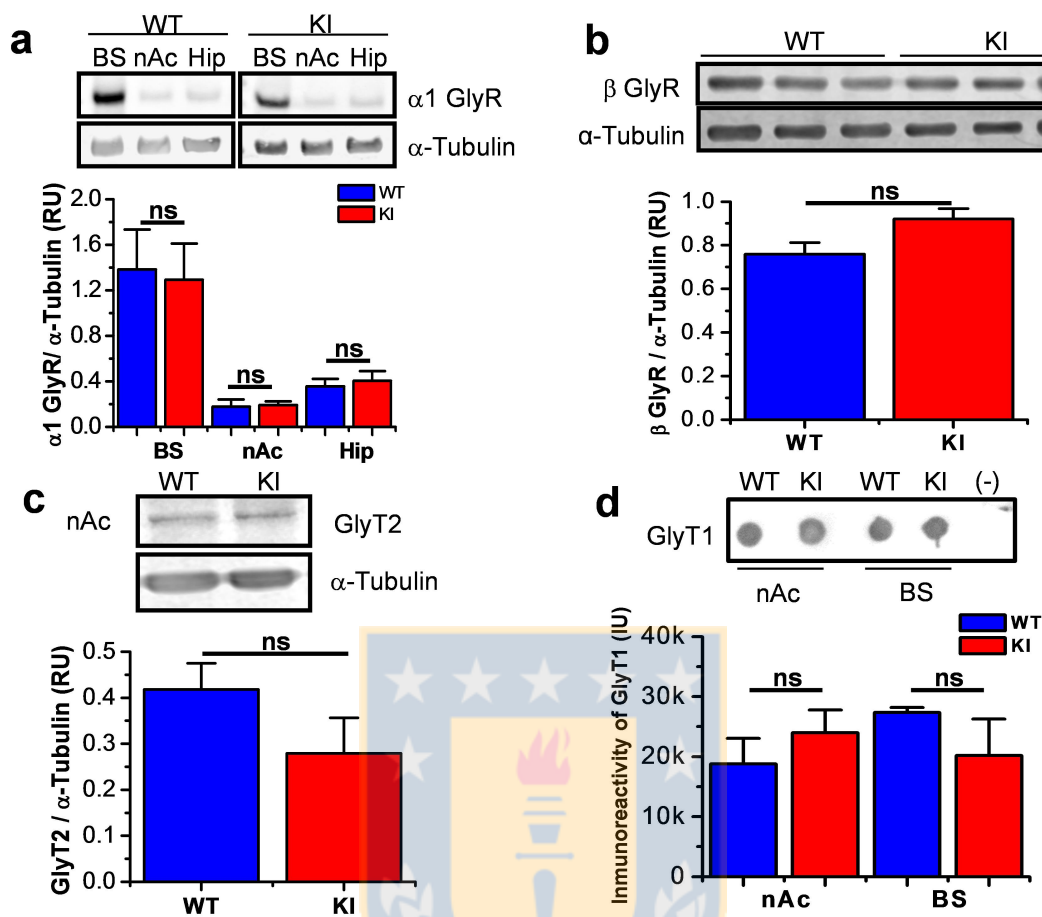


**Figura 11. Expresión de mRNA para las subunidades de R-Gli y GlyT2 en nucleus accumbens en cerebro de ratón.**

El gel electroforético muestra la presencia de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y GlyT2 en nucleus accumbens (nAc) y tronco encefálico (BS). GAPDH fue usado como control de carga, H<sub>2</sub>O como control de PCR y como control positivo se usaron vectores de expresión para  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . bp: pares de bases.

### 2.1.2 Niveles de proteínas glicinérgicas en nucleus accumbens de ratón WT y

**KI:** De esta manera, con los datos de PCR (Figura 11), caracterizamos la presencia de proteínas glicinérgicas usando técnicas de análisis proteómico, como Western blot y dot blot. Evaluamos los niveles de proteínas  $\alpha 1$ ,  $\beta$ , GlyT2 y GlyT1 en nAc. Encontramos niveles relativos a  $\alpha$ -tubulina (control de carga) bajos de R-Gli  $\alpha 1$  en nAc e Hipocampo, en relación a los observados en BS (Figura 12a) en donde se observó una alta expresión del receptor, como ya se detalló en esta tesis (Figura 8a). Por otro lado, se observó una alta expresión de R-Gli  $\beta$  respecto a  $\alpha$ -tubulina (Figura 12b), datos que se relacionan con los analizados anteriormente (Figura 8b). Además, tanto GlyT2 (Figura 12c) como GlyT1 (Figura 12d) fueron encontrados en nucleus accumbens. No encontramos diferencias entre animales WT y KI en ninguna de las proteínas evaluadas. En conjunto, los resultados confirman la presencia de proteínas relacionadas con la potencial generación de corrientes glicinérgicas (fásicas y tónicas) en nAc. Por lo tanto, el siguiente paso fue evaluar si el receptor se ensambla y se transporta a la membrana, así pudimos determinar la ubicación de R-Gli en la neurona accumbal y posteriormente su función.



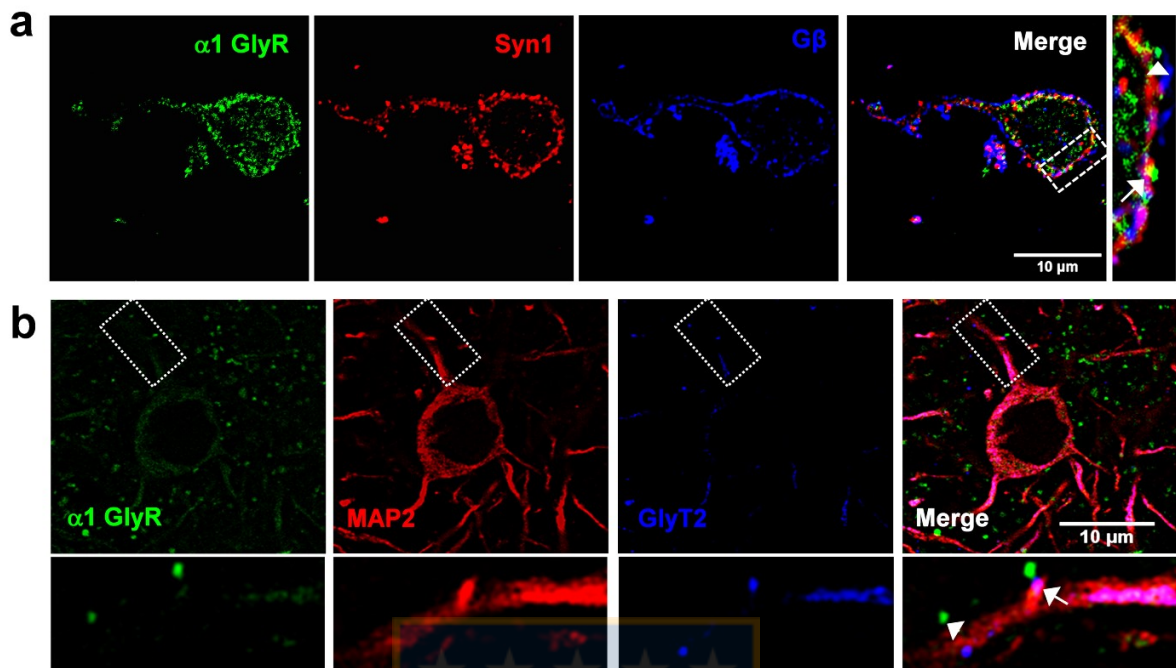
**Figura 12. Proteínas glicinérgicas en nucleus accumbens de ratón WT y KI.**

**a)** Western blot de tronco encefálico (BS), nucleus accumbens (nAc) e hipocampo (Hip) de animales WT y KI, para R-Gli  $\alpha$ 1 usando como control de carga  $\alpha$ -tubulina. **b)** Western blot en triplicado de nAc de ratones WT y KI, para R-Gli  $\beta$  usando como control de carga  $\alpha$ -tubulina. El gráfico muestra altos niveles relativos a  $\alpha$ -tubulina de R-Gli  $\beta$  en nAc. **c)** Western blot de nAc de ratones WT y KI, para GlyT2 usando como control de carga  $\alpha$ -tubulina. El gráfico muestra la presencia de GlyT2 en nAc. **d)** Dot blot de nAc y BS de animales WT y KI, para GlyT1. El gráfico muestra la cuantificación de la inmunorreactividad de los puntos de GlyT1. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM ( $\alpha$ 1 n=4;  $\beta$  n=3; GlyT2 n=6 y GlyT1 n=3), n= número de animales. ns: no significativo, One-way ANOVA.

### 2.1.3 Localización de R-Gli $\alpha 1$ en neuronas de nucleus accumbens: La

expresión de R-Gli  $\alpha 1$  y GlyT2 en nAc, nos sugeriría la presencia de sinapsis inhibitoria glicinérgica en esta región. Es por ello, que para determinar si los receptores se localizan en regiones sinápticas o no sinápticas, como en neuronas espinales (Figura 10), usamos la técnica de inmunocitoquímica sobre neuronas enzimáticamente dissociadas y en rebanadas obtenidas de nucleus accumbens. Observamos la detección de R-Gli  $\alpha 1$  en la membrana neuronal y de sinapsina 1 (proteína presente en las vesículas sinápticas; Syn1), como control de marcaje en membrana usamos G $\beta$  (Huang et al., 1997) (Figura 13a). En el recuadro de ampliación se muestran receptores en aposición con Syn1, que corresponderían a receptores sinápticos (flecha, Figura 13a) y agrupaciones de R-Gli  $\alpha 1$  aislados que estarían localizados en posiciones no sinápticas (cabeza de flecha, Figura 13a). Además, determinamos la localización de R-Gli  $\alpha 1$  y GlyT2 en rebanadas coronales de nAc. Usando como marcador neuronal a MAP2, observamos la presencia de R-Gli  $\alpha 1$  y GlyT2. Interesantemente, en el cuadro de zoom observamos que R-Gli  $\alpha 1$  y GlyT2 aposicionan entre sí, indicando la presencia de sinapsis glicinérgica al igual que en neuronas dissociadas (flecha, Figura 13b). De forma similar, encontramos agrupaciones de receptores aislados que corresponderían a receptores no sinápticos (cabeza de flecha, Figura 13b).





**Figura 13. Localización neuronal de R-Gli  $\alpha 1$  en neuronas de nucleus accumbens.**

**a)** Microfotografía confocal de plano central de neurona disociada, se observa la detección de R-Gli  $\alpha 1$  (verde), sinapsina 1 (rojo) y  $G\beta$  (azul). Agrupaciones de R-Gli  $\alpha 1$  están especialmente en la membrana neuronal ( $G\beta$ ) y en el proceso primario. Además se muestra aposición de R-Gli  $\alpha 1$  con Syn1 (recuadro), sugiriendo la presencia de R-Gli sinápticos (flecha) y la detección de R-Gli  $\alpha 1$  aislados que corresponderían a receptores no sinápticos (cabeza de flecha). **b)** Microfotografía confocal que muestra un plano central de una neurona localizada en rebanada coronal de nAc, en la cual se observa la detección de R-Gli  $\alpha 1$  (verde), MAP2 (rojo) y GlyT2 (azul). Se observa la presencia de agrupaciones de R-Gli  $\alpha 1$  y la aposición de R-Gli  $\alpha 1$  con GlyT2 (recuadro), sugiriendo la presencia de receptores sinápticos (flecha) y R-Gli  $\alpha 1$  aislados no sinápticos (cabeza de flecha). Las barras de calibración representan 10  $\mu m$ .

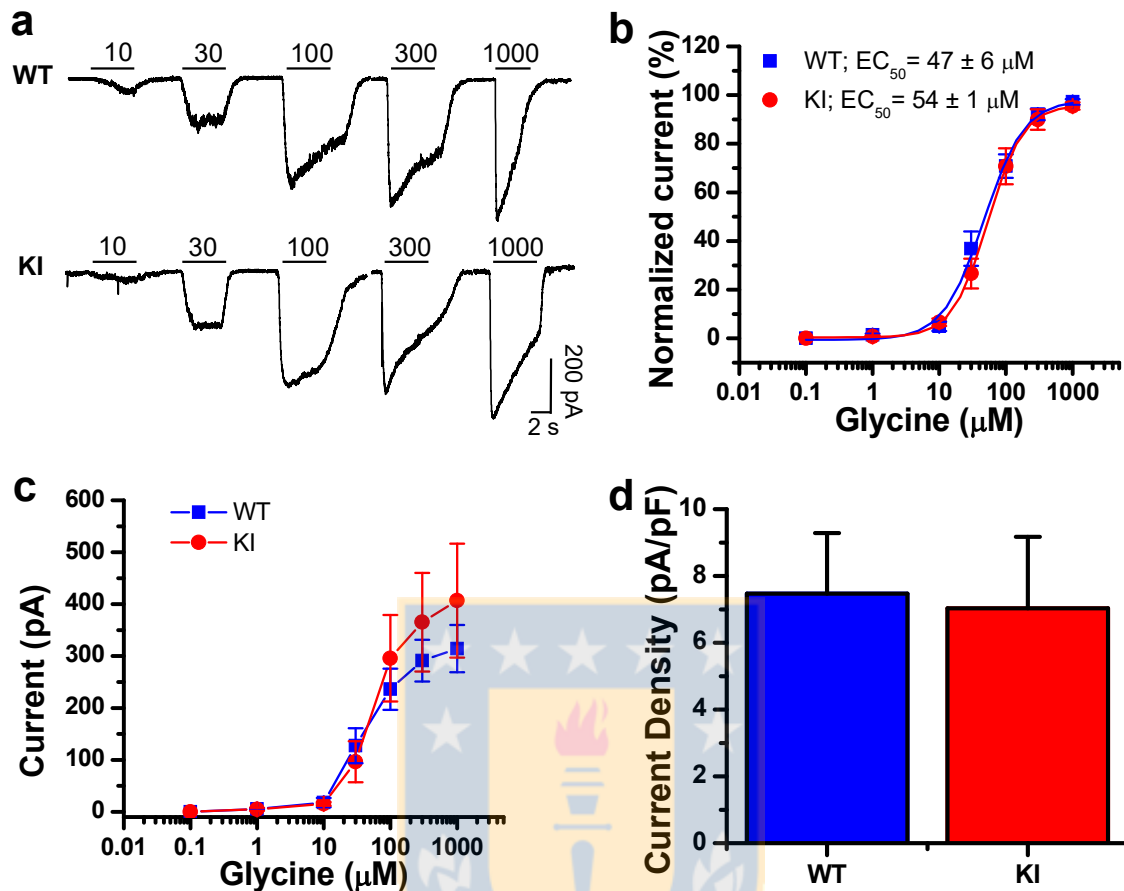
## 2.2 Sensibilidad a glicina en neuronas disociadas de nAc, VTA y PFC

Los datos de PCR, western blot e Inmunocitoquímica, sugieren que en nucleus accumbens pudiese existir un input glicinérgico que podría regular la excitabilidad del sistema mesolímbico dopaminérgico. Es por ello, que usando la técnica de disociación enzimática de neuronas accumbales WT, KI y D1-GFP, evaluamos las propiedades de las corrientes activadas por glicina. Además, usando ratones WT, quisimos examinar la presencia de receptores de glicina funcionales en VTA y PFC.

**2.2.1 Nucleus accumbens (nAc):** Los datos obtenidos demostraron la existencia de R-Gli funcionales en nAc en neuronas WT y KI. En la figura 14a se observan trazos representativos de corrientes evocadas por glicina (10-1000  $\mu\text{M}$ ). El análisis de estas corrientes, determinó que no hubo diferencias entre WT y KI en  $\text{EC}_{50}$  (WT:  $47 \pm 6 \mu\text{M}$ ,  $n=15$  y KI:  $54 \pm 1 \mu\text{M}$ ,  $n=12$ ; ns  $p>0.05$ , One-Way ANOVA) (Figura 14b). Además, estos valores fueron similares a los previamente obtenidos por el laboratorio en neuronas espinales y células HEK transfectadas con  $\alpha 1$  (Tabla 1) (Aguayo et al., 2014; Mariqueo et al., 2014; Yevenes et al., 2008) y sugirió que los receptores presentes en nAc son de tipo  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1\beta$  y/o  $\alpha 2\beta$ . Análisis adicionales, mostraron una menor amplitud máxima (WT:  $314 \pm 46 \text{ pA}$ ,  $n=15$  y KI:  $407 \pm 110 \text{ pA}$ ,  $n=12$ , ns  $p>0.05$ , One-Way ANOVA) y densidad de corriente de glicina (WT:  $7.5 \pm 2 \text{ pA/pF}$ ,  $n=11$  y KI:  $7 \pm 2 \text{ pA/pF}$ ,  $n=8$ , ns  $p>0.05$ , One-Way ANOVA) en nAc (Figura 14c y d), en comparación a datos previos en neuronas de

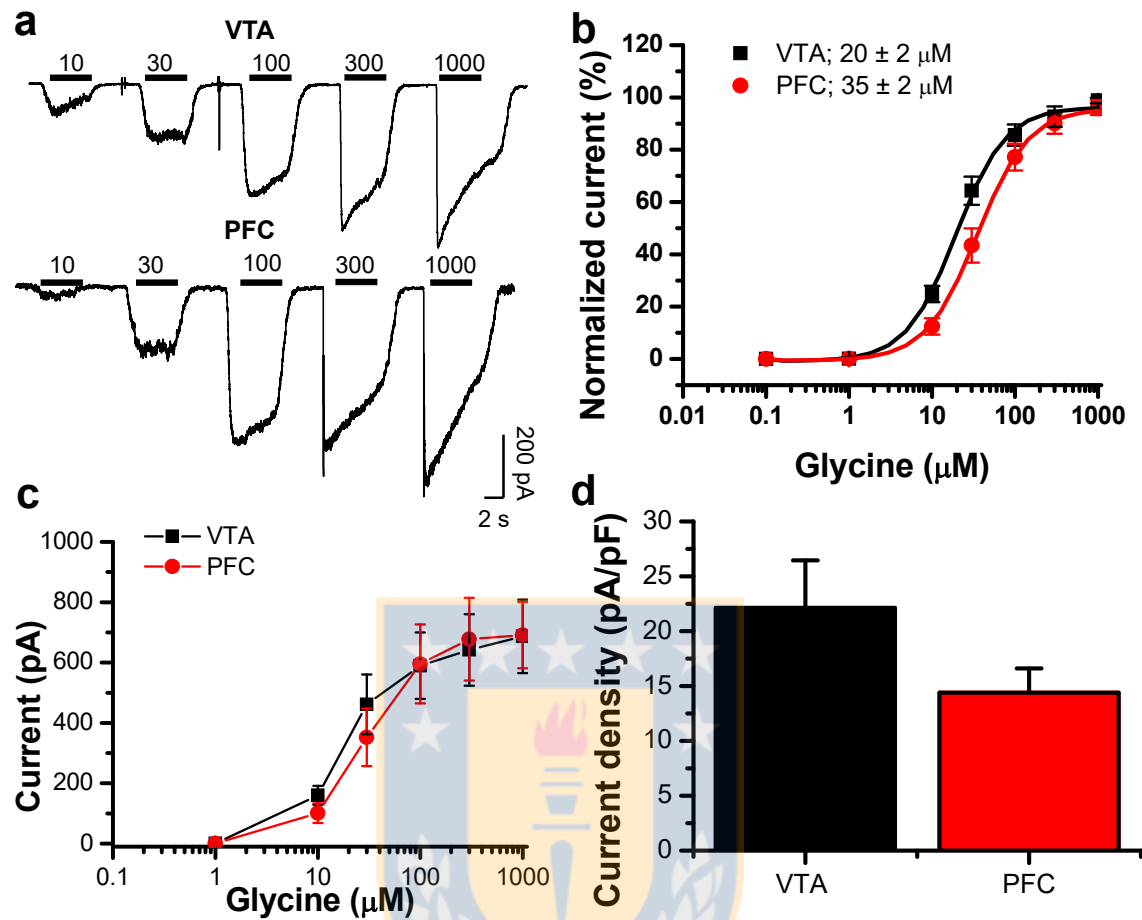
médula espinal y tronco encefálico (Aguayo et al., 2014; Mariqueo et al., 2014). Esto estaría dado por la baja expresión de R-Gli  $\alpha$ 1 en nAc (Figura 12a),

**2.2.2 Área Tegmental Ventral (VTA) y Corteza prefrontal (PFC):** El VTA se localiza en la región ventral posterior y el PFC en la parte dorsal media anterior del cerebro de ratón. El VTA se conecta con proyecciones dopaminérgicas al nAc y PFC, en donde libera dopamina y causa el efecto de refuerzo a estímulos vitales y adictivos (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005). Reportes previos han demostrado la presencia de corrientes de glicina en estas dos áreas (Lu and Ye, 2011; Salling and Harrison, 2014; Ye et al., 2001). Así, tanto en VTA como en PFC se encontraron corrientes evocadas de glicina (Figura 15a). Los análisis demostraron que VTA y PFC poseen distintos  $EC_{50}$  (VTA:  $20 \pm 2 \mu\text{M}$ ,  $n=8$  y PFC:  $35 \pm 2 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ,  $*p<0.05$ , One-way ANOVA), siendo el  $EC_{50}$  de neuronas de PFC cercano al de neuronas de nAc (Figura 15b). Las corrientes máximas fueron similares entre ambas regiones (VTA:  $687 \pm 122 \text{ pA}$ ,  $n=8$  y PFC:  $691 \pm 110 \text{ pA}$ ,  $n=6$ ,  $ns p>0.05$ , One-Way ANOVA), y significativamente más altas a las encontradas en nAc ( $***p < 0.001$ , One-way ANOVA) (Figura 15c), del mismo modo las densidades de corrientes fueron mayores en VTA y PFC (VTA:  $22 \pm 4 \text{ pA/pF}$ ,  $n=8$  y PFC:  $14 \pm 2$ ,  $n=6$ )(Figura 18d), comparado con nAc ( $*p<0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 17d).



**Figura 14. Neuronas disociadas de nucleus accumbens son sensibles a glicina.**

**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas de glicina (1-1000  $\mu\text{M}$ ) en neuronas disociadas de ratones WT y KI. **b)** El gráfico muestra la curva concentración a glicina (1- 1000 mM) de neuronas accumbales WT (cuadrados azules) y KI (círculos rojos); WT (n=15 neuronas) y KI (n=12 neuronas). **c)** Gráfico muestra la amplitud de corrientes a distintas concentraciones de glicina. **d)** Gráfico muestra similares valores de densidad de corriente para neuronas WT ( $7.5 \pm 2 \text{ pA/pF}$ , n=11 neuronas) y KI ( $7 \pm 2 \text{ pA/pF}$ , n=8 neuronas). Todos los datos representan el promedio  $\pm$  SEM.



**Figura 15. Neuronas dissociadas desde VTA y PFC son sensibles a glicina.**

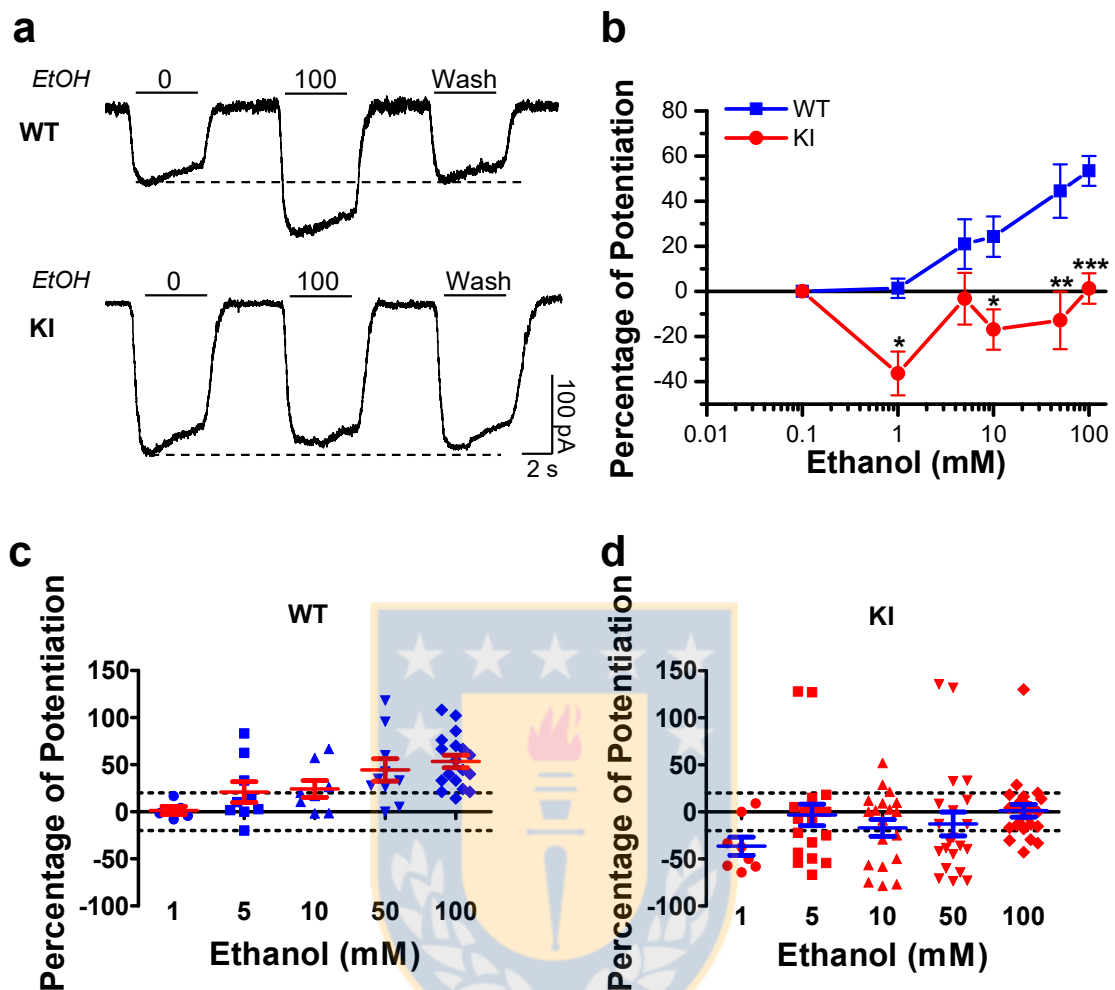
**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas de glicina (10-1000  $\mu\text{M}$ ) en neuronas dissociadas de VTA y PFC de ratones WT. **b)** El gráfico muestra la curva concentración a glicina (1- 1000  $\mu\text{M}$ ) de neuronas de VTA (cuadrados negros) y PFC (círculos rojos). VTA (n=8 neuronas) y PFC (n=6 neuronas). **c)** Gráfico muestra la amplitud de corrientes evocadas por la curva concentración respuesta de glicina. **d)** Gráfico muestra valores de densidad máxima de corriente para neuronas de VTA ( $22 \pm 4 \text{ pA/pF}$ , n=8 neuronas) y PFC ( $14 \pm 2 \text{ pA/pF}$ , n=6 neuronas). Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM.

## 2.3 Efectos de etanol en neuronas disociadas de nAc, VTA y PFC

**2.3.1 Nucleus accumbens (nAc):** Analizamos la modulación de etanol en neuronas accumbales WT y KI. Interesantemente, encontramos que las neuronas WT fueron potenciadas por etanol, mientras que las KI fueron insensibles (Figura 16a). Dicha modulación fue significativamente diferente a los 1 (WT:  $1 \pm 4$  %, n=5 versus KI:  $-36 \pm 10$  %, n=8; \* $p < 0.05$  One-way ANOVA), 10 (WT:  $24 \pm 9$  %, n=8 versus KI:  $-17 \pm 9$  %, n=19; \* $p < 0.05$  One-way ANOVA), 50 (WT:  $44 \pm 12$  %, n=10 versus KI:  $-13 \pm 13$  %, n=21; \*\* $p < 0.01$  One-way ANOVA) y 100 mM de etanol (WT:  $53 \pm 6$  %, n=18 versus KI:  $1 \pm 6$  %, n=22; \*\*\* $p < 0.001$  One-way ANOVA) (Figura 16b, c y d). El análisis de cada neurona registrada, mostró que las neuronas WT son mayormente potenciadas (17/18 células a 100 mM Etanol) (Figura 16c). Interesantemente, observamos diferentes respuestas en KI. Específicamente, se pudo observar que 3-4 neuronas se potenciaron ( $>20\%$  de potenciación con etanol), cerca de 5-10 fueron no sensibles (entre 20 y  $-20\%$  de potenciación con etanol), y 4-13 fueron inhibidas ( $<-20\%$  de potenciación con etanol) (Figura 16d). Además, al realizar estudios de canal único en modalidad out-side out, encontramos que neuronas WT aumentan la probabilidad de apertura del canal (nPo) significativamente (Figura 17a y b), en comparación a neuronas KI cuando fueron aplicadas con etanol 10 mM (WT:  $92 \pm 26$  %, n=10 versus KI:  $-5 \pm 34$  %, n=14; \* $p < 0.05$  One-way ANOVA) (Figura 17b). Esta modulación no implicó modificación en la conductancia del canal, siendo similares para WT y KI en ausencia (WT:  $40 \pm 3$  pS, n=10 versus KI:  $37 \pm 2$  pS, n=14) y presencia de 10 mM etanol (WT:  $43 \pm 4$  pS, n=10 versus KI:  $36 \pm 4$  pS, n=14) (Figura 17c).

**2.3.2 Área Tegmental Ventral (VTA) y Corteza prefrontal (PFC):** Nuestros datos muestran que tanto neuronas del VTA como del PFC fueron sensibles a etanol (Figura 18a). El análisis mostró que estas neuronas fueron potenciadas por 5 (VTA:  $34 \pm 9$  %, n=7 y PFC:  $29 \pm 7$  %, n=7), 10 (VTA:  $16 \pm 10$  %, n=7 y PFC:  $31 \pm 10$  %, n=7), 50 (VTA:  $32 \pm 11$  %, n=7 y PFC:  $39 \pm 10$  %, n=7) y 100 mM de etanol (VTA:  $73 \pm 12$  %, n=7 y PFC:  $63 \pm 8$  %, n=7) (Figura 19b). Por lo tanto, estos datos demostraron que R-Gli en VTA y PFC son sensibles a etanol.





**Figura 16. Efectos de etanol en neuronas de nAc WT y KI.**

**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas por glicina de neuronas WT y KI, mostrando los efectos de 100 mM etanol medidos por el EC<sub>10</sub> de glicina (15  $\mu$ M).

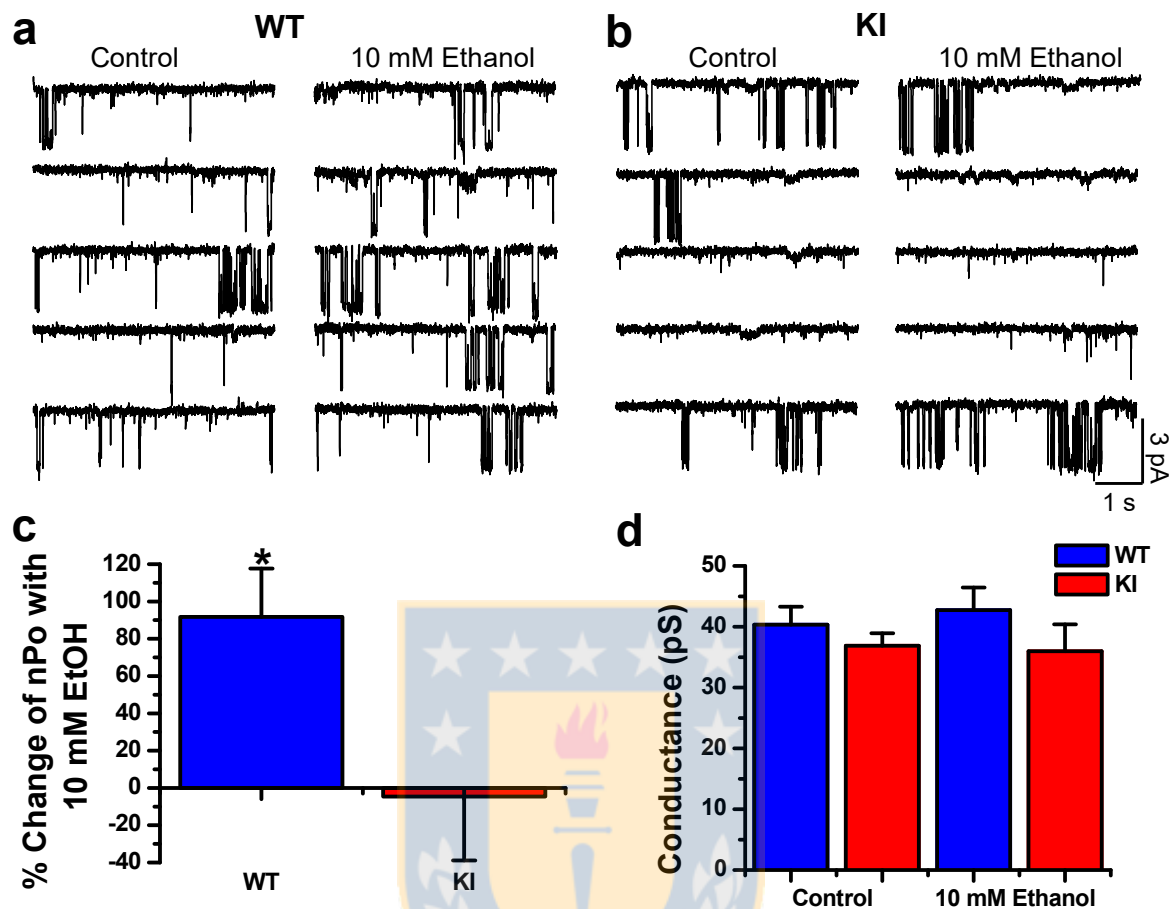
**b)** El gráfico resume los efectos de distintas concentraciones de etanol (1-100 mM)

en WT (cuadrado azul) y KI (círculo rojo). **c y d)** Gráfico scatter muestra el análisis

de cada neurona WT (c) y KI (d) registrada. Las líneas punteadas detallan el rango de potenciación (>20%), insensibilidad (20% a -20%) e inhibición (<-20%).

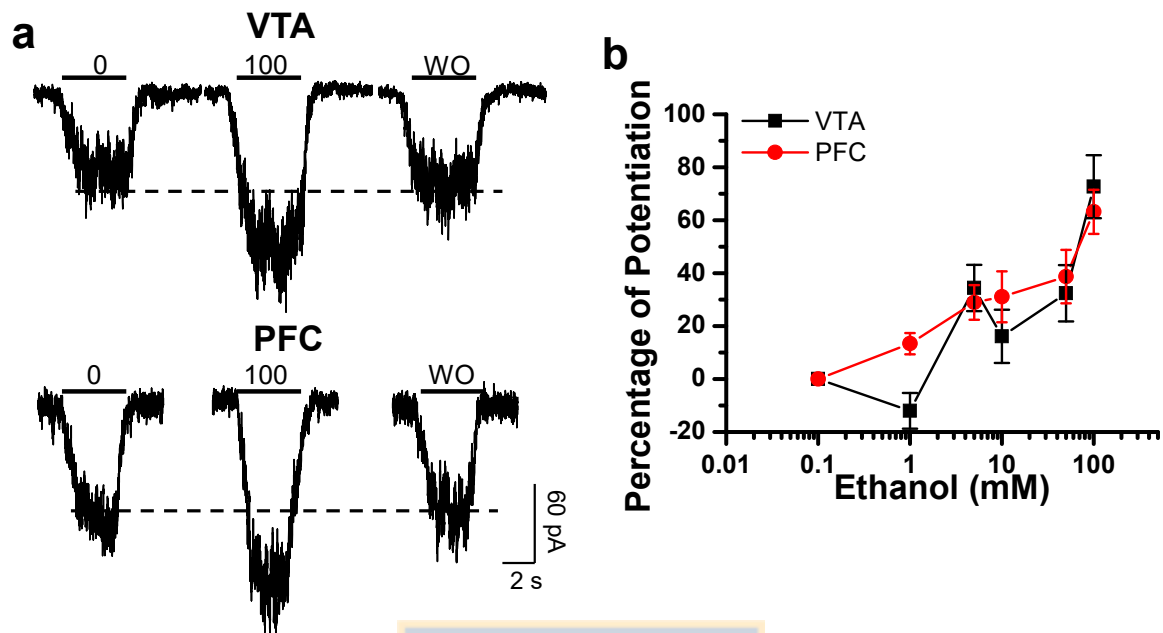
Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n=12 neuronas WT, 22 neuronas KI), \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 (One-way ANOVA).





**Figura 17. Efectos de 10 mM de etanol en corrientes unitarias de glicina en neuronas de nAc WT y KI.**

**a-b)** Trazos representativos de registros de canal único de neuronas disociadas de WT y KI, perfundidos con 10  $\mu$ M de glicina, antes y durante la aplicación de 10 mM etanol. **c)** El gráfico muestra el porcentaje de cambio de la probabilidad de apertura del receptor (nPo) durante la aplicación de 10 mM de etanol en WT (barra azul) y KI (barra roja) **d)** El gráfico resume el análisis de la conductancia promedio de R-Gli, no siendo afectado por 10 mM etanol. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n=10 y 14, WT y KI respectivamente), \*p<0.05 (One-way ANOVA).



**Figura 18. Efectos de etanol en neuronas de VTA y PFC.**

**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas por glicina de neuronas de VTA y PFC, mostrando los efectos de 100 mM etanol con un  $EC_{10}$  de glicina (10  $\mu$ M y 15  $\mu$ M, para VTA y PFC respectivamente). **b)** El gráfico resume los efectos de distintas concentraciones de etanol (1-100 mM) en VTA (cuadrado negro) y PFC (círculo rojo). Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n=7 neuronas). WO= wash out.

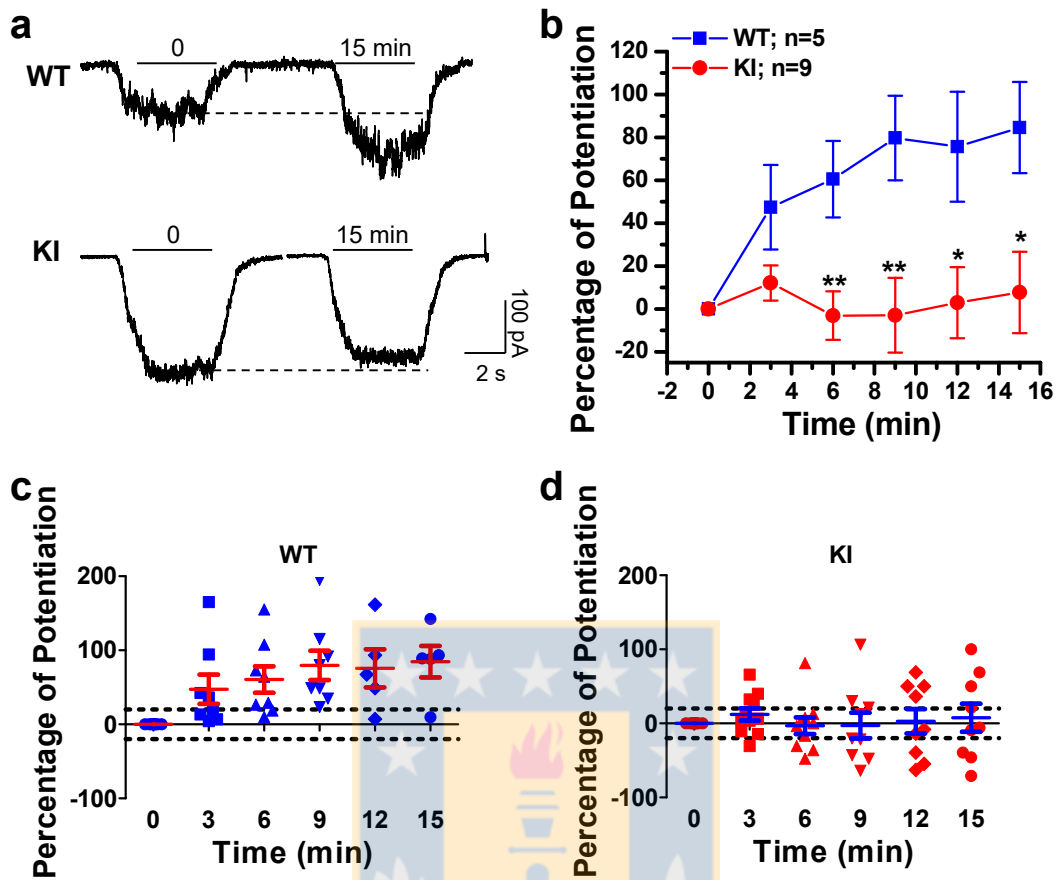
## 2.4 Efectos de la activación de proteína G en neuronas dissociadas de nAc, VTA y PFC

El reemplazo de las lisinas 385 y 396 en R-Gli  $\alpha 1$ , generó un receptor que no fue modulado por la activación de proteína G, esto debido a que el dímero  $G\beta\gamma$  se asocia a la región intracelular en donde se ubican estas lisinas (Aguayo et al., 2014; Yevenes et al., 2008). Usando la técnica de patch clamp y la diálisis intracelular de GTP- $\gamma$ -S (análogo no hidrolizable de GTP), se pudo determinar el porcentaje de potenciación de las corrientes evocadas por glicina después de la difusión de GTP- $\gamma$ -S al interior de la neurona, esto debido a que GTP- $\gamma$ -S se intercambia por GDP, en la proteína G inactiva, activándola de forma permanente,  $G\alpha s$  se disocia de  $G\beta\gamma$  y lo libera para que pueda interaccionar con R-Gli  $\alpha 1$ .

**2.4.1 Nucleus accumbens (nAc):** R-Gli de nAc fueron sensibles a la modulación por etanol, por ello, es necesario saber si esta modulación es mediada por  $G\beta\gamma$ . Usando animales WT y KI determinamos la importancia de los residuos KK385-386 en la modulación de etanol mediada por  $G\beta\gamma$  en nAc. Así, nuestros datos mostraron una potenciación significativa de las corrientes evocadas por glicina en neuronas WT después de 15 minutos de diálisis intracelular (Figura 19a), mientras que en KI la potenciación no se observó (WT:  $85 \pm 21$  %,  $n=5$  versus KI:  $8 \pm 19$  %,  $n=9$ ;  $*p<0.05$  One-way ANOVA). Esta diferencia también fue significativa a los 6 (WT:  $61 \pm 18$  %,  $n=5$  versus KI:  $-3 \pm 11$  %,  $n=9$ ;  $**p<0.01$  One-way ANOVA), 9 (WT:  $80 \pm 20$  %,  $n=5$  versus KI:  $-3 \pm 17$  %,  $n=9$ ;  $**p<0.01$  One-way ANOVA) y 12

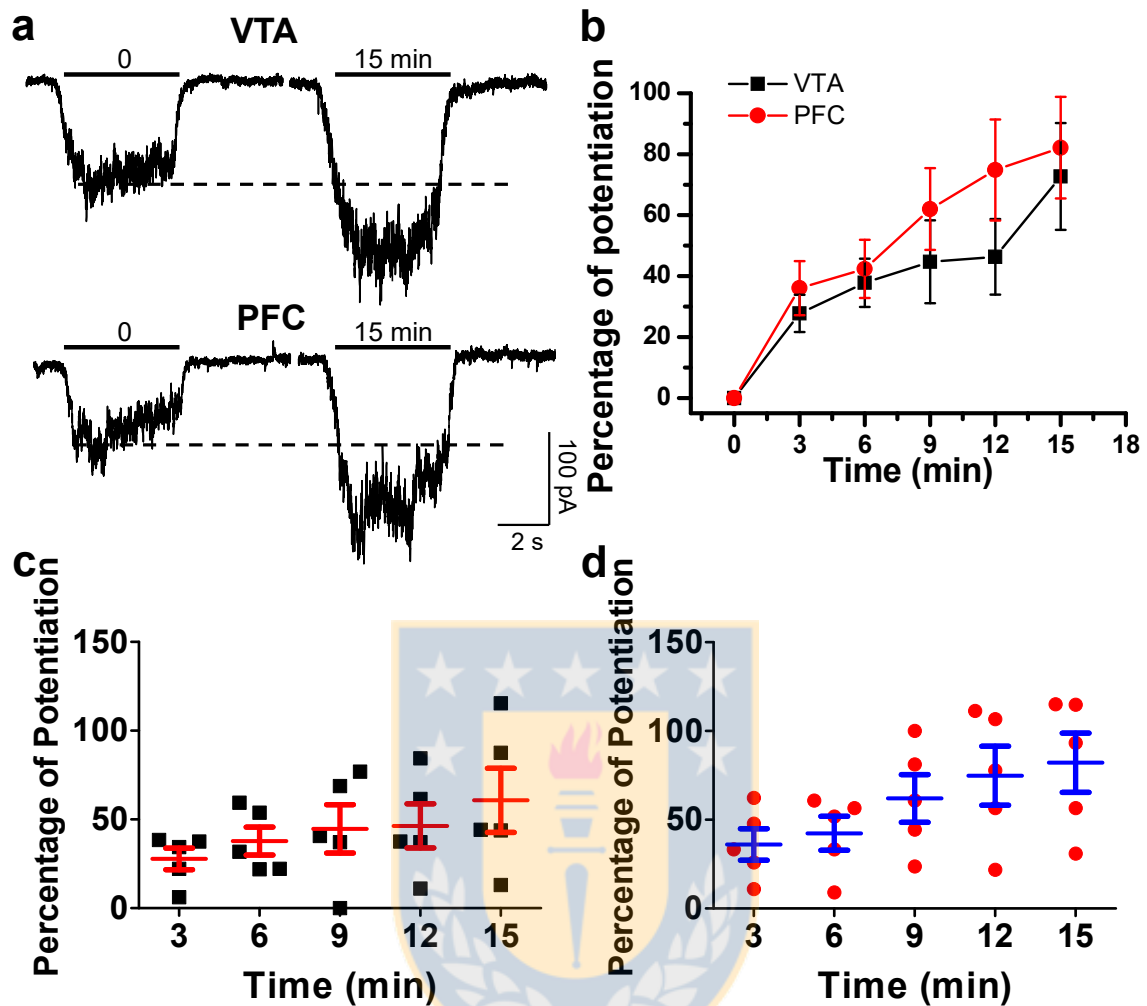
min de diálisis (WT:  $76 \pm 26$  %, n=5 versus KI:  $3 \pm 27$  %, n=9; \*p<0.05 One-way ANOVA) (Figura 19b). Interesantemente, se observó 3 poblaciones de respuesta en neuronas KI, las cuales 3-4 neuronas fueron potenciadas (>20% de potenciación con etanol), cerca de 3-5 fueron no sensibles (entre 20 y -20% de potenciación con etanol), y 3 fueron inhibidas (<-20% de potenciación con etanol) (Figura 23d). Esta distribución no fue observada en neuronas WT (Figura 19c).

**2.4.2 Área Tegmental Ventral (VTA) y Corteza prefrontal (PFC):** Como antes mencionamos, la modulación de etanol en R-Gli  $\alpha 1$  está mediada por  $G\beta\gamma$ . Por lo tanto, para conocer la composición de los R-Gli en VTA y PFC, evaluamos las corrientes evocadas de glicina en neuronas dializadas con GTP- $\gamma$ -S. Tanto neuronas dissociadas de VTA como de PFC, fueron moduladas por GTP- $\gamma$ -S (Figura 20a), aumentando sus corrientes evocadas por glicina después de 3 (VTA:  $28 \pm 6$  %, n=5 y PFC:  $36 \pm 9$  %, n=5), 6 (VTA:  $38 \pm 8$  %, n=5 y PFC:  $42 \pm 10$  %, n=5), 9 (VTA:  $45 \pm 14$  %, n=5 y PFC:  $62 \pm 13$  %, n=5), 12 (VTA:  $46 \pm 12$  %, n=5 y  $75 \pm 17$  %, n=5) y 15 minutos de difusión intracelular (VTA:  $73 \pm 18$  %, n=5 y  $82 \pm 17$  %, n=5) (Figura 20b). La caracterización de qué subunidad de R-Gli está involucrada en esta sensibilidad, se abordará como proyección en futuros experimentos, debido a que en esta tesis nos focalizamos en nAc.



**Figura 19. Efectos de la activación de proteína G por GTP- $\gamma$ -S en neuronas de nAc WT y KI.**

**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas de glicina de neuronas disociadas de nAc WT y KI, muestran la amplitud de corriente de glicina al inicio y después de 15 min de diálisis intracelular de GTP- $\gamma$ -S. **b)** El gráfico de tiempo resume los efectos de GTP- $\gamma$ -S en neuronas WT (cuadrado azul) y KI (círculo rojo). **c-d)** Gráficos scatter detallan los efectos de GTP- $\gamma$ -S en cada neurona registrada, en azul (WT) y rojo (KI). Las líneas punteadas detallan el rango de potenciación (>20%), insensibilidad (20% a -20%) e inhibición (<-20%). Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n=5 neuronas WT, n=9 neuronas KI), \*p<0.05, \*\*p<0.01 (One-way ANOVA).



**Figura 20.** Efectos de la activación de proteína G por GTP- $\gamma$ -S en neuronas de VTA y PFC.

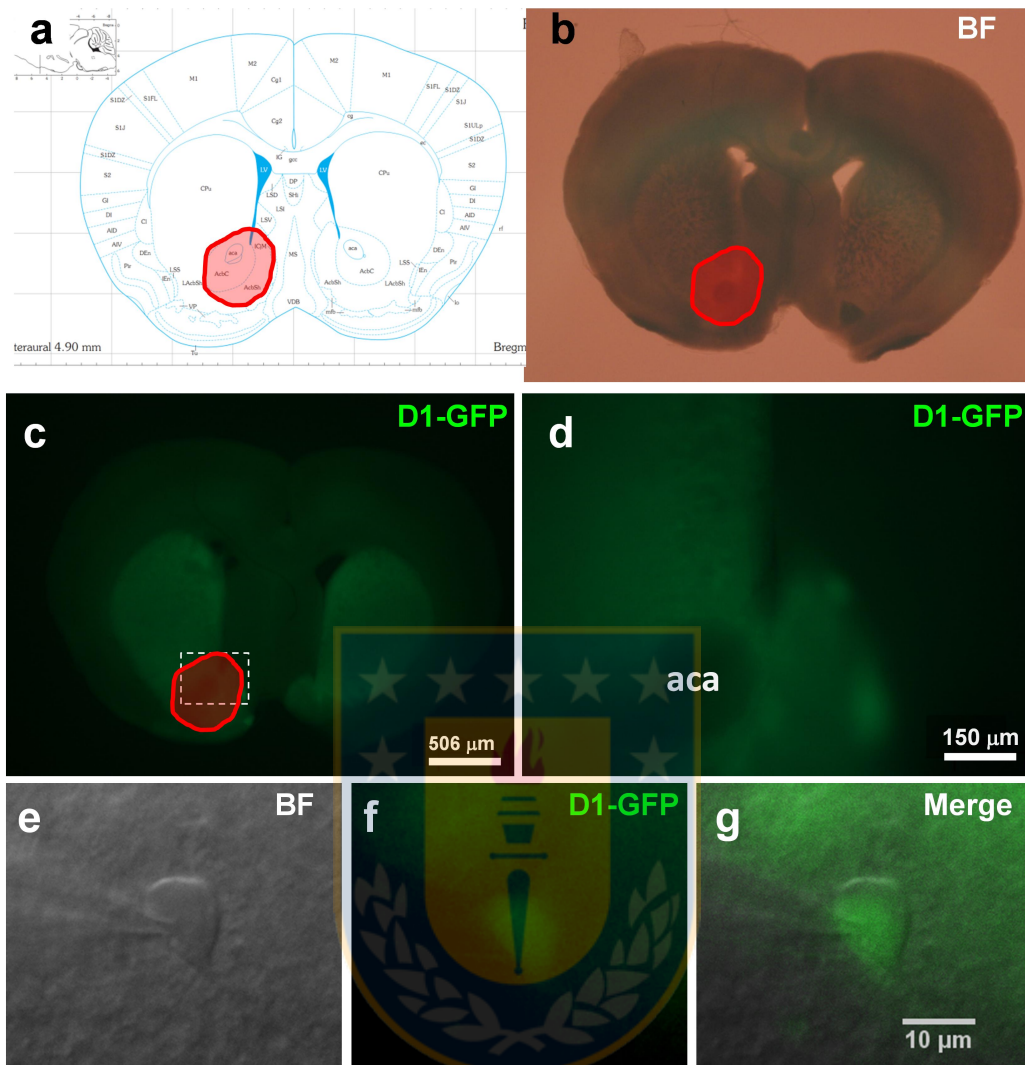
**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas de glicina de neuronas disociadas VTA y PFC, muestran el efecto de la activación de proteína G después de 15 min de diálisis intracelular de GTP- $\gamma$ -S. **b)** El gráfico de tiempo resume los efectos de GTP- $\gamma$ -S en neuronas de VTA (cuadrado negro) y PFC (círculo rojo). **c-d)** Gráficos scatter detallan los efectos de GTP- $\gamma$ -S en cada neurona registrada, en negro (VTA) y rojo (PFC). Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM ( $n=5$  neuronas para VTA y PFC). No significativo, One-Way ANOVA.

## **2.5 Comparación de sensibilidad a glicina y etanol en medium spiny neurons de ratones D1-GFP en nucleus accumbens**

Dopamina afecta la transmisión en el nAc vía distintos subtipos de receptores de dopamina (DAR) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Los DAR de tipo D1 (D1Rs y D5Rs) están principalmente localizados en medium spiny neurons (MSN) GABAérgicas que se proyectan al VTA, mientras que los de tipo D2 (D2R, D3R y D4R) se expresan en MSNs que se proyectan al pallidum ventral (VP) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011) (Figura 1). Por lo tanto, conocer el tipo de MSN que expresan R-Gli sensibles a etanol, nos ayudaría a entender un posible mecanismo de inhibición que estaría involucrado en la red dopaminérgica. Usando un animal transgénico, en el cual las MSNs expresan DAR de tipo D1a acoplados al reportero fluorescente EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (Figura 21), se evaluaron la sensibilidad a glicina y etanol. El racional fue el siguiente: 1.- El determinar qué tipo de MSNs presentan R-Gli sensibles a etanol, nos sugeriría que tipo de vía ocupan los R-Gli para comunicarse con el VTA, la vía directa (mediada por MSNs D1) o indirecta (mediada por MSNs D2) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). 2.- Los receptores de D1a están acoplados a proteína G compuesto por  $G\alpha_s$  y  $G\beta\gamma$ , esto es importante ya que datos de nuestro laboratorio han demostrado que etanol aumenta el intercambio de GDP por GTP en  $G\alpha_s$  (Yevenes et al., 2011). Por lo tanto, la activación de D1 activaría proteína G y liberaría a  $G\beta\gamma$ , el cual podría interaccionar con R-Gli  $\alpha_1$  en la MSN.

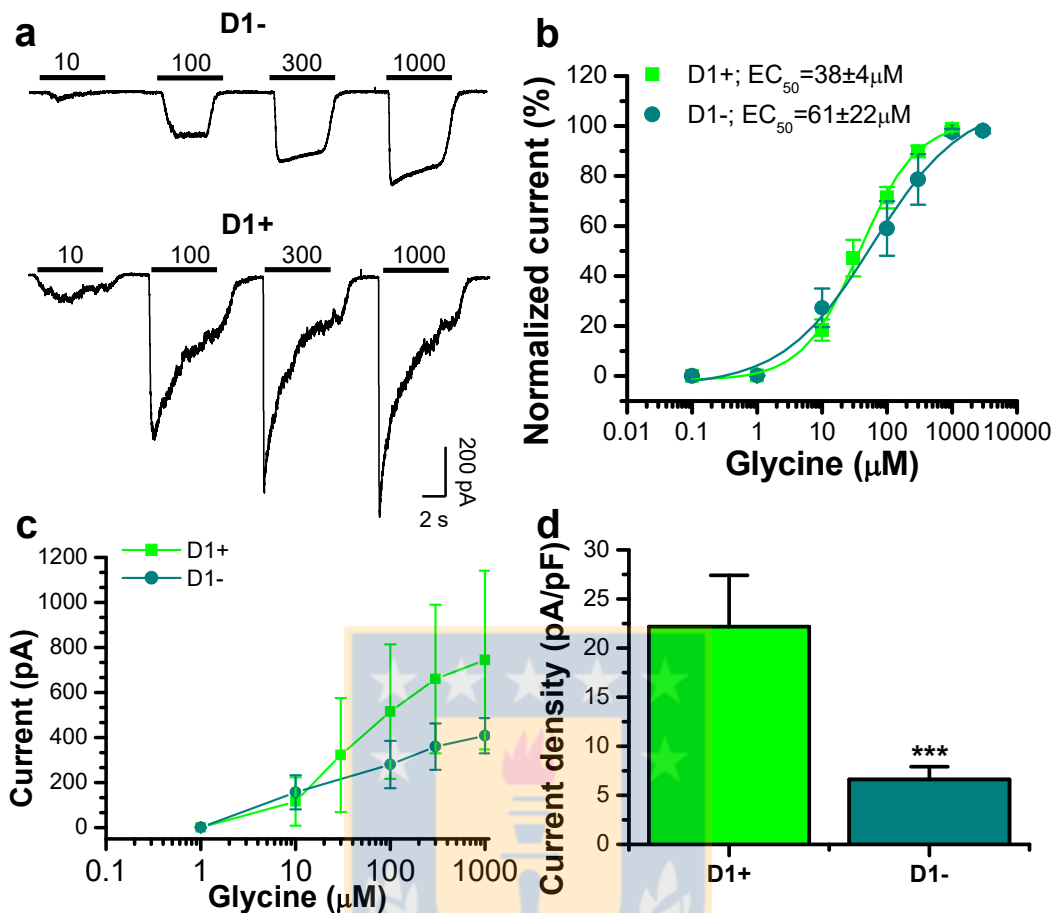
**2.5.1 Sensibilidad a glicina:** Debido a la heterogeneidad de neuronas presentes en nAc, nos enfocamos en determinar las diferencias entre MSNs D1 positivas (D1+) y MSN que no estaban marcadas por GFP (D1-). Usando el ratón D1-GFP pudimos seleccionar específicamente las MSN D1+ en nAc (Figura 21). En cortes coronales de ratones D1-GFP (Figura 21a y b), observamos la presencia del reportero fluorescente en MSN que expresan D1 (Figura 21e-g). Interesantemente, encontramos que neuronas D1+ tienen un menor  $EC_{50}$  que las neuronas D1- (D1+:  $38 \pm 4 \mu\text{M}$ , n=14 versus D1-:  $61 \pm 22 \mu\text{M}$ , n=10), si bien estas diferencias no fueron significativas (ns:  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA), sugieren que MSNs D1+ serían más sensibles a glicina (Figura 22a y b). Además, MSNs D1+ tuvieron un promedio de corrientes máximas evocadas por glicina más alto, que las MSNs D1- (D1+:  $744 \pm 397 \text{ pA}$ , n=14 versus D1-:  $408 \pm 78 \text{ pA}$ , n=10, ns:  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA) (Figura 22c). Interesantemente, se encontraron diferencias significativas en la densidad de corrientes de glicina, siendo mayor en neuronas D1+ (D1+:  $22 \pm 5 \text{ pA/pF}$ , n=6 versus D1-:  $7 \pm 1 \text{ pA/pF}$ , n=21; \*\*\* $p < 0.001$ , One way ANOVA) (Figura 22d). Estos datos apoyaron la hipótesis que MSNs D1 preferentemente expresan R-Gli.





**Figura 21. Imágenes de rebanadas coronales de ratón D1-GFP.**

**a)** La fotografía muestra esquemáticamente en el corte coronal de cerebro de ratón ( $40\ \mu\text{m}$ ), en donde se destaca en rojo el nAc. **b)** La fotografía muestra campo claro de corte coronal de ratón D1-GFP ( $300\ \mu\text{m}$ ) las áreas presentes en el corte coronal, en donde se destaca en rojo nAc. **c)** Se observa corte coronal de ratón, en donde se observa la fluorescencia de neuronas D1-GFP. **d)** Amplificación en nAc en donde se observa la comisura anterior (aca) y la fluorescencia de neuronas D1-GFP. **e-g)** Microscopía DIC-IR, muestran neurona siendo registrada en campo claro y fluorescencia D1+.

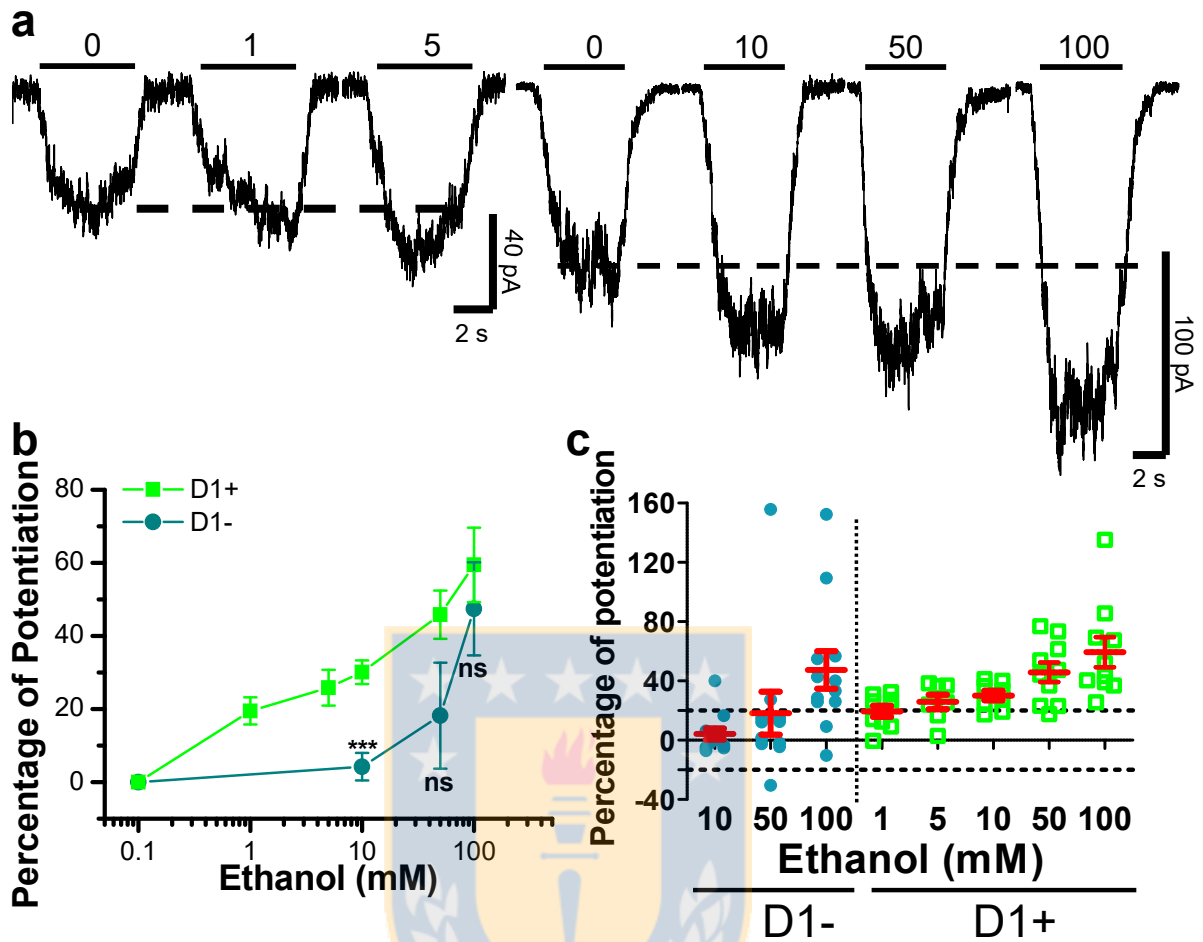


**Figura 22. MSNs D1 disociadas de nucleus accumbens son más sensibles a glicina.**

**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas de glicina (10-1000  $\mu\text{M}$ ) en neuronas disociadas de ratón D1-GFP. **b)** El gráfico muestra la curva concentración a glicina (1- 1000  $\mu\text{M}$ ) de MSNs D1+ (cuadrados verdes) y curva concentración a glicina (1- 3000  $\mu\text{M}$ ) para MSNs D1- (círculos cyan). Los  $\text{EC}_{50}$  en ambos genotipos,  $38 \pm 4 \mu\text{M}$  D1+ (n=14 neuronas) y  $61 \pm 22 \mu\text{M}$  D1- (n=10 neuronas). **c)** Gráfico muestra la amplitud de corrientes evocadas por la curva concentración respuesta de glicina. **d)** Gráfico muestra densidad de corriente para MSNs D1+ ( $22 \pm 5 \text{ pA/pF}$ , n=6 neuronas) y D1- ( $7 \pm 1 \text{ pA/pF}$ , n=21 neuronas). Todos los datos representan el promedio  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$ , One way ANOVA.

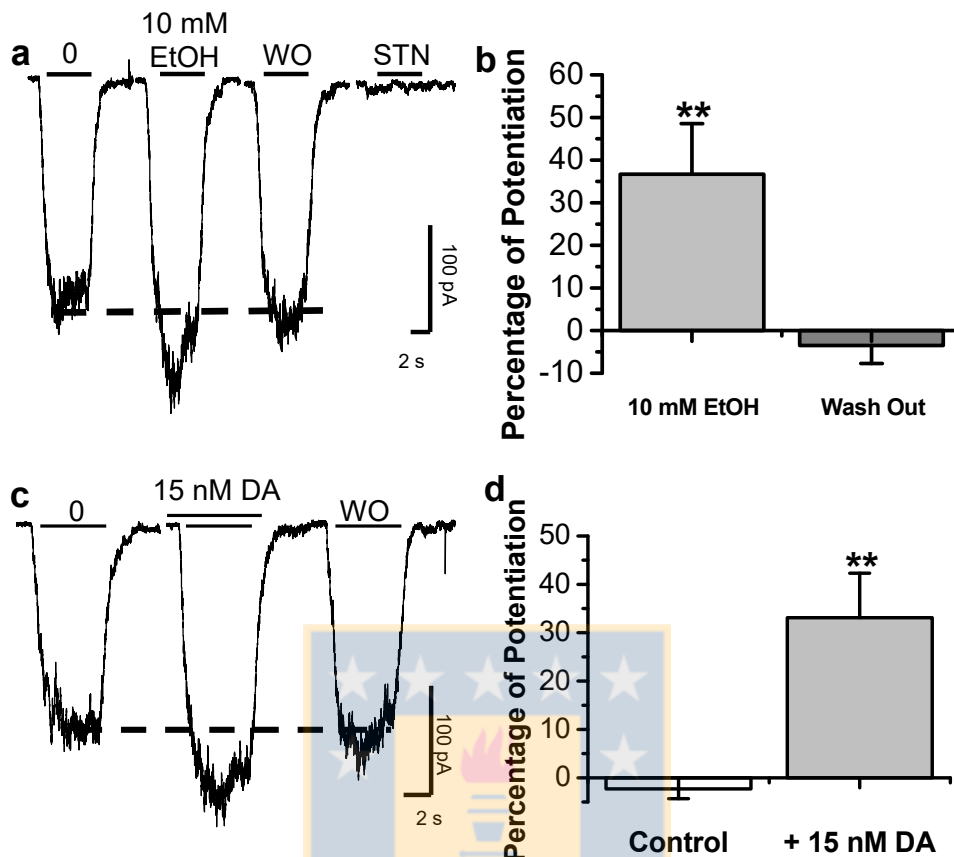
**2.5.2 Sensibilidad a etanol:** Los datos anteriores indican que neuronas que expresan D1+, tienen R-Gli y poseen una mayor densidad de corriente (Figura 22d), lo cual nos sugiere que estas neuronas expresan R-Gli (Tabla 4). Así, evaluamos electrofisiológicamente la sensibilidad de estos receptores a bajas y altas concentraciones de etanol (1, 5, 10, 50 y 100 mM). Los efectos de altas concentraciones de etanol (50-100 mM) se han reportado que potencia a R-Gli  $\alpha 1$  en células HEK y neuronas espinales (Aguayo et al., 2014; Mariqueo et al., 2014; Yevenes et al., 2010). Además nuestros datos demuestran que MSNs de nAc (Figura 16) y neuronas de VTA y PFC son sensibles a estas concentraciones (Figura 18). Sin embargo, a concentraciones menores o iguales a 10 mM, se ha reportado potenciación de R-Gli  $\alpha 1$  sólo a nivel de canal único (Figura 17) (Yevenes et al., 2008). Así, usando neuronas disociadas de nAc, encontramos que MSNs D1+ fueron sensibles a bajas concentraciones de etanol (Figura 23). Los análisis mostraron que MSNs D1+ fueron potenciadas por 1 mM de etanol en  $27 \pm 5 \%$  (n=12), por 5 mM en  $31 \pm 5 \%$  (n=9) y por 10 mM en  $21 \pm 7 \%$ , (n=8), siendo esta última concentración significativamente diferente a las MSNs D1- ( $4 \pm 4 \%$ , n=12; \*\*\*p<0.001, One way ANOVA) (Figura 23a y b). De hecho, las MSNs D1+ respondieron de manera más homogénea que las MSNs D1- (Figura 23c). Además, no se observaron diferencias a 50 (D1+:  $46 \pm 7 \%$ , n=10 versus D1-:  $20 \pm 14 \%$ , n=13, ns p>0.05, One way ANOVA) y 100 mM de etanol (D1+  $60 \pm 10 \%$ , n=10 versus D1-:  $47 \pm 13 \%$ , n=13, ns p>0.05, One way ANOVA) (Figura 23b y c). Por lo tanto, analizamos los efectos de etanol a 10 mM en las corrientes macroscópicas evocadas por glicina, y demostramos que las MSNs D1+ fueron

sensibles a etanol presentando una potenciación de  $37 \pm 12 \%$  (n=22) (Figura 24a y b). Por consiguiente, evaluamos los efectos de dopamina (DA) en las corrientes macroscópicas evocadas de glicina en MSNs D1+. Así, aplicamos por 30 segundos dopamina (DA) a 15 nM, para activar los DAR D1, y luego co-aplicamos 15  $\mu$ M de glicina para evocar la respuesta (Figura 24c). Interesantemente, encontramos que después de la aplicación de DA, la corriente de cloruro aumentó significativamente, potenciándola en un  $33 \pm 9\%$  (\*\*p<0.01, One-Way ANOVA, n=7) (Figura 24d), siendo este efecto reversible (Figura 24c y d). Además, al analizar las corrientes de canal único, en configuración out-side out, confirmamos la sensibilidad a etanol 10 mM en MSNs D1+ (Figura 25a) aumentando la probabilidad de apertura de manera significativa (Control:  $0.22 \pm 0.05$ , n=7; etanol 10 mM:  $0.66 \pm 0.16$ , n=6; \*p<0.05, One-Way ANOVA) (Figura 25b) y no alterando la conductancia del canal (Control:  $40 \pm 2$  pS, n=7; etanol 10 mM:  $41 \pm 2$  pS, n=6, ns p>0.05, One way ANOVA) (Figura 25c). Estos datos, sugirieron que la activación de DAR D1 por dopamina modula positivamente a R-Gli en nAc, lo cual explicaría los efectos potenciadores de bajas concentraciones de etanol (1, 5 y 10 mM) en MSNs D1 de nAc.



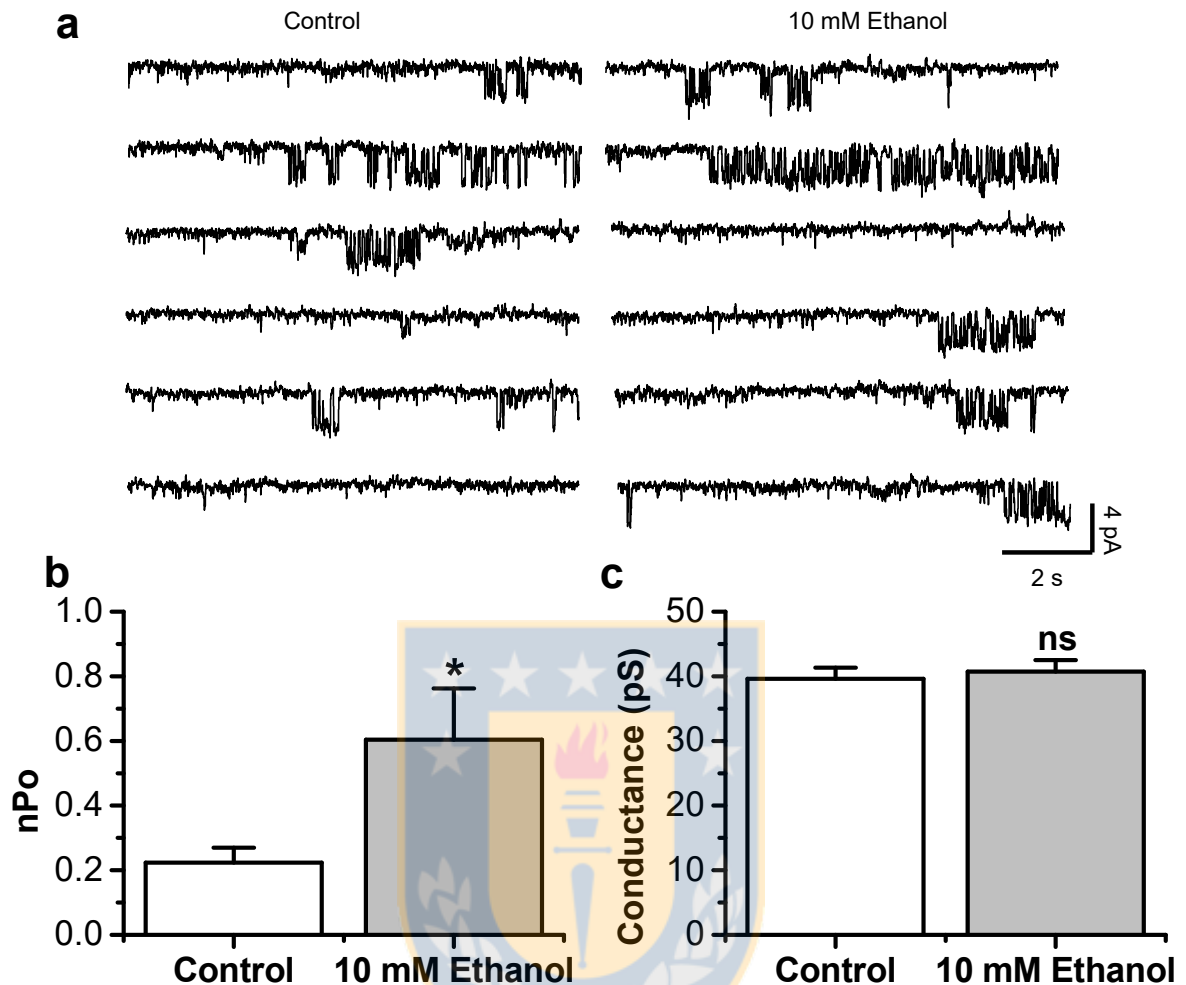
**Figura 23. Efectos de etanol en MSNs de nAc.**

**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas por glicina de dos MSNs D1+, mostrando los efectos de 1, 5, 10, 50 y 100 mM etanol medidos por el EC<sub>10</sub> de glicina (15  $\mu$ M). **b)** El gráfico resume los efectos de distintas concentraciones de etanol (1-100 mM) en MSNs D1+ (cuadrado verde) y D1- (círculo cian). **c)** Gráfico scatter en donde se observa el análisis de cada MSN D1+ y D1- registrada. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de MSNs D1+ y D1- (n=10 y 13 neuronas respectivamente), ns  $p > 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (One way ANOVA).



**Figura 24. Efectos de 10 mM de etanol y dopamina en MSNs D1+.**

**a)** Trazos representativos de corrientes evocadas por glicina de neuronas D1+, mostrando los efectos de 10 mM etanol medidos al EC<sub>10</sub> de glicina (15 μM). Además se muestra la inhibición total de la corriente de cloruro de glicina por 1 μM de estriquina (STN). **b)** El gráfico resume los efectos de 10 mM etanol en corrientes evocadas por glicina, en donde se muestra una potenciación de 37 ± 12 % (n=22 neuronas). **c)** Trazos representativos de corrientes evocadas por glicina de neuronas D1+, mostrando los efectos de la pre aplicación de 15 nM de dopamina por 30 segundos previo a la co-aplicación de 15 μM de glicina. **d)** El gráfico resume los efectos de 15 nM DA en corrientes evocadas por glicina, en donde se muestra una potenciación de 33 ± 9% (n=7 neuronas). Los datos representan el promedio ± SEM. \*\*p<0.01, One-Way ANOVA. WO: wash out.



**Figura 25. Efecto de 10 mM de etanol en corrientes unitarias de glicina en MSNs D1+.**

**a)** Trazos representativos de registros de canal único (out-side out) de neuronas disociadas de MSNs D1+, perfundidos con 10  $\mu$ M de glicina, antes y durante la aplicación de 10 mM etanol. **b)** El gráfico muestra la probabilidad de apertura del receptor (nPo) después de la aplicación de 10 mM de etanol en neuronas D1+. **c)** El gráfico resume datos de conductancia promedio de R-Gli, siendo no afectado por 10 mM etanol. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n=10 y 14, neuronas WT y KI, respectivamente), ns  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$  (One-way ANOVA).

### 2.5.3 Comparación de respuestas de glicina y etanol en nAc, VTA y PFC: La

técnica de disociación neuronal en modelos de ratones transgénicos como KI y D1-GFP, nos aportó datos electrofisiológicos con finalidad de demostrar que tipo de R-Gli componen estas regiones y que neuronas son importantes para la red glicinérgica en el sistema mesolímbico dopaminérgico. La Tabla 4 detalla y resume los datos obtenidos en animales WT y KI en nAc, VTA y PFC, además del uso de ratones D1-GFP, que complemento los datos, aportando el tipo neuronal que posee R-Gli. Se observó que en nAc un porcentaje de 81 y 88 % de las neuronas registradas tuvieron corrientes de glicina en ratones WT y KI, respectivamente. Interesantemente, todas las medium spiny neurons D1+ presentaron corrientes de Cl<sup>-</sup> mediadas por glicina (100 %), mientras que las D1- sólo el 66 % fueron sensibles. En VTA y PFC todas las neuronas registradas presentaron corrientes de cloruro mediado por glicina. Los EC<sub>50</sub> no variaron sustancialmente, siendo el de neuronas D1+ de nAc, de VTA y PFC más sensibles a glicina (EC<sub>50</sub>= 38 ± 4 μM, 20 ± 2 μM y 35 ± 2 μM, respectivamente). La densidad de corriente fue diferente en MSNs D1+ de nAc, siendo significativamente mayor en relación a MSNs D1- (Figura 22), por otro lado se encontró valores similares en VTA y levemente menor en PFC (Figura 15). Todas las neuronas analizadas son potenciadas por 100 mM etanol, a excepción de MSNs de animales KI (Figura 16). De manera interesante, se demostró que neuronas D1+ son más sensibles a bajas concentraciones de etanol (Figura 23), siendo significativamente diferentes a 10 mM (D1+: 37 ± 12 %, n=22 versus D1-: 4 ± 4 %, n=13, \*p<0.05, One-way ANOVA) (Tabla 4).



**TABLA 4. Resumen de efectos de glicina y etanol en neuronas de nAc, VTA y PFC**

Area	Neurons	Glycine sensitive	insensitive	EC <sub>50</sub> (μM)	Current Density (pA/pF)	I <sub>max</sub> (pA)	10 mM EtOH Potentiation (%)	100 mM EtOH Potentiation (%)	GTP-γ-S potentiation (%)
nAc	WT	81 % (42)	19 % (10)	47 ± 6 (15)	7.5 ± 2 (11)	314 ± 46 (15)	24 ± 9 (12)	56 ± 7 (12)	85 ± 21 (5)
	KI	88 % (57)	12 % (8)	54 ± 1 (12)	7 ± 2 (8)	407 ± 110 (12)	2 ± 5 (22) (*)	1 ± 6 (22) (***)	8 ± 20 (9) (*)
	D1+	100 % (41)	0 % (0)	38 ± 4 (14)	22 ± 5 (6)	744 ± 397 (14)	37 ± 12 (22)	60 ± 10 (10)	nd
	D1-	66 % (23)	34 % (12)	61 ± 22 (10)	7 ± 1 (21) (***)	408 ± 78 (10)	4 ± 4 (13) (*)	47 ± 13 (13)	nd
VTA	WT	100 % (20)	0 % (0)	20 ± 2 (8)	22 ± 4 (8)	687 ± 122 (8)	34 ± 9 (7)	73 ± 12 (7)	73 ± 18 (5)
PFC	WT	100 % (18)	0 % (0)	35 ± 2 (6)	14 ± 2 (6)	691 ± 110 (6)	29 ± 7 (7)	63 ± 8 (7)	82 ± 17 (5)

Los valores representan el promedio ± SEM. Los valores fueron ajustados por la ecuación:  $I_{glicina} = I_{max}$   $\frac{[glicina]^{nH}}{[glicina]^{nH} + [EC_{50}]^{nH}}$  usando el software Origin 8.0.

Sensibilidad a glicina fue examinada a 1000 μM de glicina.

EC<sub>50</sub>: Concentración de glicina en el que se obtiene el 50% de la respuesta máxima

nH: coeficiente de Hill

I<sub>max</sub>: Corriente máxima en presencia de concentración saturante de glicina (1000 μM)

Los EC<sub>10</sub> calculados para cada R-Gli fue usado para realizar los experimentos de sensibilidad a etanol y de GTP-γ-S. “% Potentiation” corresponde al cambio en presencia de 100 mM de etanol con respecto al control de EC<sub>10</sub> de glicina. El “% potentiation at 15 min” corresponde al cambio en presencia del análogo no hidrolizable de GTP (GTP-γ-S, 200 mM) medido después de 15 minutos de diálisis intracelular.

nd: no determinado

En paréntesis el número de casos (n).

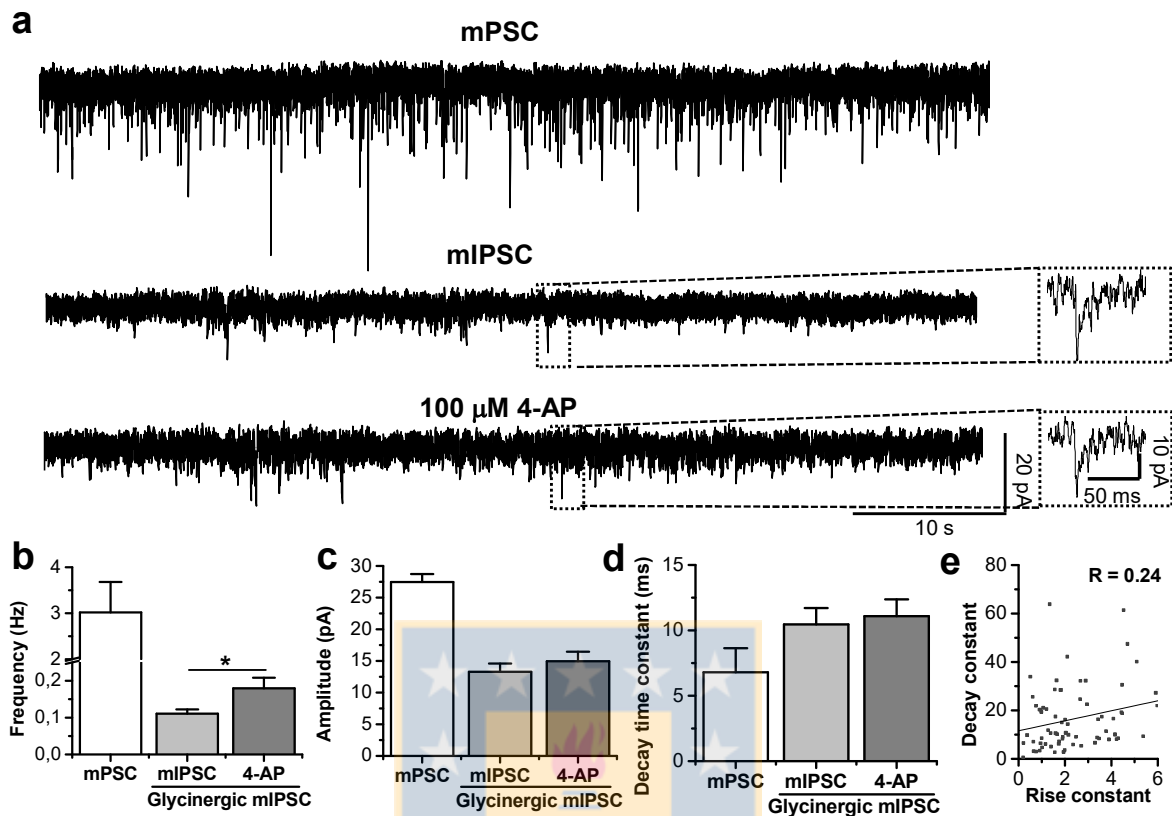
\*p<0.05, \*\*\*p<0.001, One-Way ANOVA

## 2.6 Corrientes sinápticas de glicina en rebanadas de nAc de WT, KI y D1-GFP.

Datos previos de esta tesis, sugirieron que neuronas de nAc tienen las proteínas necesarias para la presencia de corrientes postsinápticas inhibitorias de glicina (IPSC) (Figuras 11, 12 y 13). De hecho, registros en presencia de TTX (500 nM), D-APV (40  $\mu$ M), CNQX (10  $\mu$ M) y bicuculina (10  $\mu$ M), mostraron la presencia de mIPSCs en rebanadas de animales D1+ en nAc. (Figura 26) Para esto, aplicamos el cocktail de inhibidores antes descritos más 4-AP (4-aminopiridina, 100  $\mu$ M), que es un bloqueador selectivo de canales de K<sup>+</sup> activados por voltaje de la familia Kv1, por lo que aumentó la liberación de neurotransmisores (Smith et al., 2000). Observamos, que MSNs D1+ tuvieron mIPSC glicinérgicos que fueron de baja frecuencia ( $0.11 \pm 0.01$  Hz, n=15) y que aumentaron significativamente cuando fue aplicado 4-AP ( $0.17 \pm 0.3$  Hz, n =14, \*p<0.05 One-way ANOVA) (Figura 26a-b). No se encontraron diferencias en amplitud ( $13 \pm 1$  pA vs  $15 \pm 2$  pA, ns p>0.05, One-way ANOVA) y constante de decaimiento ( $10 \pm 1$  ms vs  $11 \pm 1$  ms, ns p>0.05, One-way ANOVA) (Figura 26c-d). No se observó correlación entre la constante de decaimiento y la constante de subida para mIPSCs (R=0.24) (Figura 26e), apoyando que estos eventos sinápticos son glicinérgicos, como ya se reportó (van Zundert et al., 2004). Estos datos fueron similares a los obtenidos en neuronas WT y KI, que tuvieron transmisión glicinérgica en miniatura y que fue sensible a STN (Figura 26a y b). Por ejemplo, los valores en WT (n=25 neuronas de 10 ratones) y KI (n=10 neuronas de 5 ratones) fueron similares en frecuencia ( $0.5 \pm 0.1$  vs  $0.7 \pm 0.2$  Hz, ns p>0.05, One-way ANOVA), amplitud ( $15 \pm 1$  vs  $17 \pm 3$  pA, ns p>0.05,

One-way ANOVA) y constante de decaimiento ( $11 \pm 1$  vs  $11 \pm 2$  ms, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 27c-e). Análisis adicionales de histogramas de probabilidad acumulada, demostraron que no existen diferencias entre los dos animales (WT y KI) en ninguno de los parámetros (Figura 27f-h). Por consiguiente, evaluamos si estas mIPSCs son sensibles a los efectos de etanol.



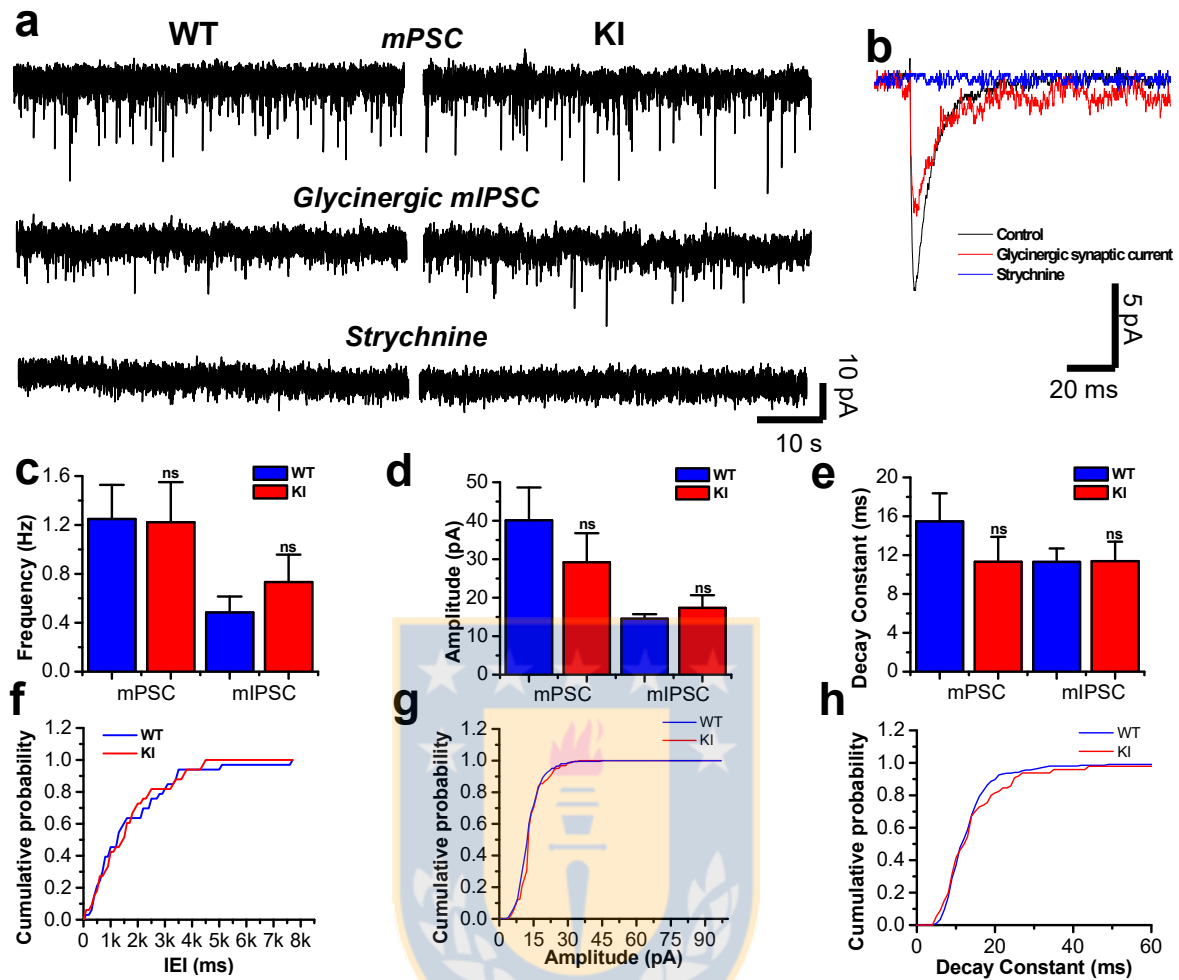


**Figura 26. Presencia de transmisión glicinérgica en MSNs D1+ de nAc.**

**a)** Trazos de corrientes sinápticas representativos de neuronas MSNs D1+, mostrando los mPSC y mIPSCs en presencia de TTX (500 nM), bicuculina (10  $\mu$ M), CNQX (10  $\mu$ M) and D-APV (50  $\mu$ M) durante la perfusión con 100  $\mu$ M 4-AP.

**b-d)** Gráficos resumen las propiedades sinápticas de Frecuencia (**b**), amplitud (**c**) y constante de decaimiento (**d**) de las corrientes mIPSCs glicinérgicas de MSNs D1+.

**e)** Gráfico de constante de subida (rise constant 10-90%) versus constante de decaimiento (37%) obtenidos de 4 neuronas controles. No se encontró correlación entre ellos ( $R=0.24$ ) Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM. ( $n=11$  neuronas mPSC,  $n=15$  neuronas control y  $n=14$  neuronas 4-AP).  $*p<0.05$ , One-way ANOVA.



**Figura 27. Presencia de mIPSCs en neuronas de nAc WT y KI.**

**a)** Trazos de corrientes sinápticas representativos de neuronas WT y KI, mostrando los mIPSCs registrados en presencia de TTX (500 nM), bicuculina (10  $\mu$ M), CNQX (10  $\mu$ M) and D-APV (50  $\mu$ M) y bloqueados totalmente por 1  $\mu$ M STN.

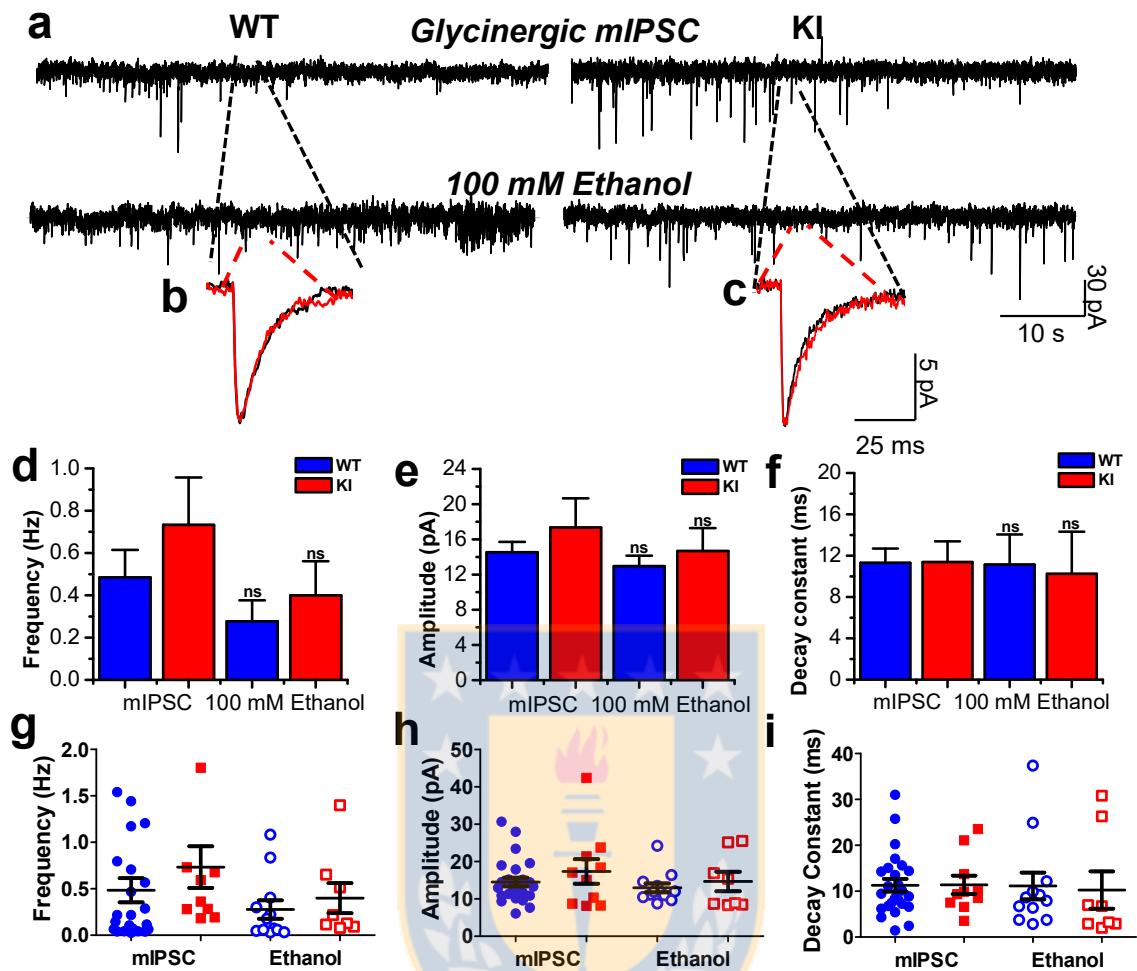
**b)** Trazo de eventos promedios de mPSC (negro), mIPSCs (rojo) y STN (azul).

**c-e)** Gráficos resumen las propiedades de las corrientes mIPSCs glicinérgicas en WT y KI.

**f- h)** Histogramas de probabilidad acumulada de frecuencia, constante de decaimiento (10-90%) y amplitud de neuronas nAc WT y KI. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM. (n=25 neuronas WT y n=10 neuronas KI). ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA.

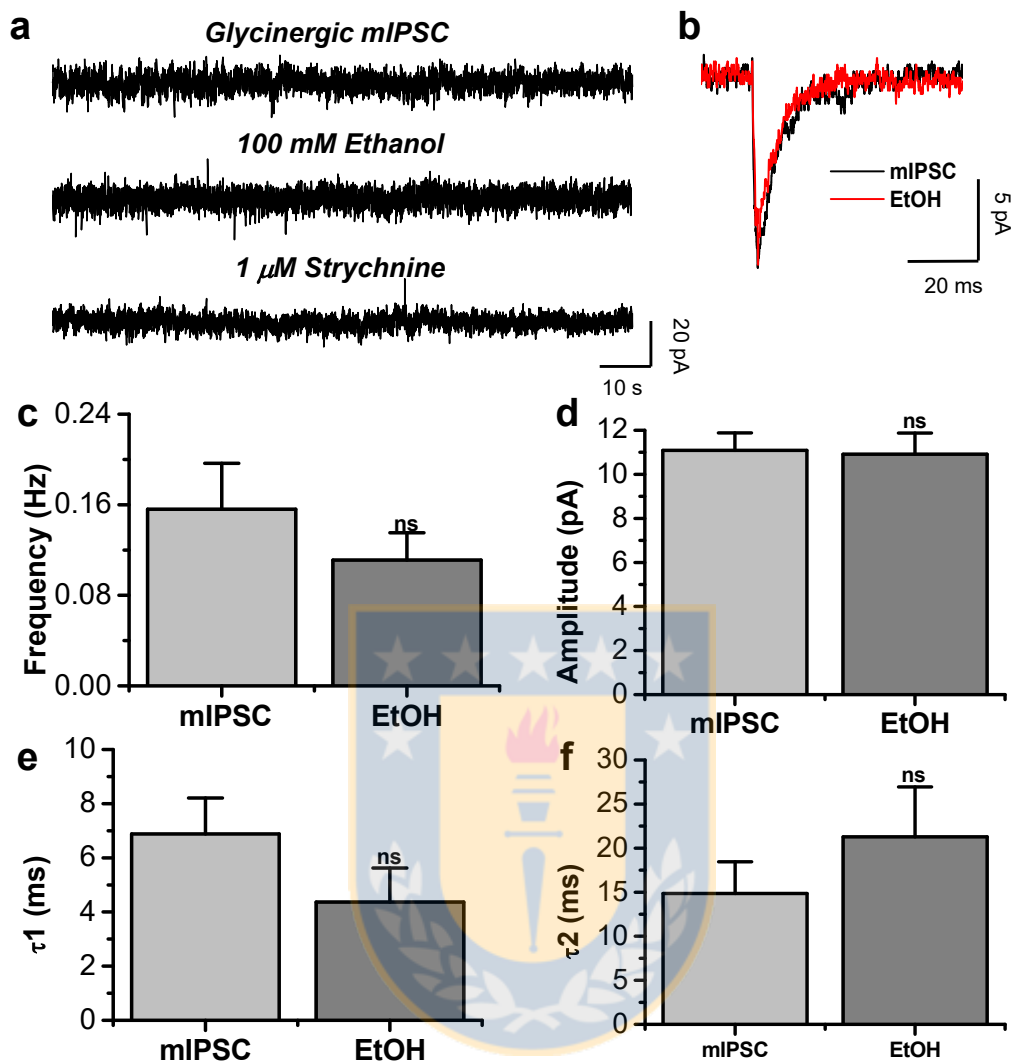
## 2.7 Efectos de etanol en IPSCs glicinérgicos en rebanadas de nAc de WT, KI y D1-GFP.

Usando la técnica de patch clamp, evaluamos las corrientes inhibitorias de Cl<sup>-</sup> en miniatura (mIPSCs) y evocadas eléctricamente (eIPSCs) en neuronas de nAc. Etanol no afectó los diferentes parámetros sinápticos de mIPSCs en WT y KI (Figura 28a-c). Por ejemplo, la frecuencia de neuronas WT fue de  $0.4 \pm 0.1$  Hz (n=25) y de KI  $0.7 \pm 0.2$  Hz (n=10, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA), mientras que con etanol fue de  $0.3 \pm 0.1$  Hz (n=12) y  $0.4 \pm 0.1$  Hz (n=8, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) para WT y KI, respectivamente (Figura 28d y g). Tampoco hubo diferencias en amplitud para neuronas WT ( $15 \pm 1$  pA versus  $13 \pm 1$  pA) y KI ( $17 \pm 3$  pA versus  $15 \pm 3$  pA, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 28e y h), ni para la constante de decaimiento (WT:  $11 \pm 1$  ms versus  $11 \pm 3$  ms; KI:  $11 \pm 2$  ms versus  $10 \pm 4$  ms, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 28f y i). Tampoco encontramos diferencias en neuronas MSNs D1+ en los parámetros de mIPSCs (Figura 29a-b). Por ejemplo, la frecuencia fue de  $0.16 \pm 0.04$  Hz (n=11) y con etanol de  $0.11 \pm 0.02$  Hz (n=12, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 29c), la amplitud ( $11 \pm 0.8$  pA versus  $11 \pm 1$  pA, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 29d) y la constante de decaimiento tau1 ( $\tau_1$ ) ( $6 \pm 1$  versus  $4 \pm 1$  ms, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 29e) no tuvieron diferencias, mientras que tau2 ( $\tau_2$ ) tuvo una tendencia no significativa a aumentar con etanol ( $15 \pm 4$  versus  $21 \pm 6$  ms, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 29f).



**Figura 28. Efectos de etanol en mIPSCs de nAc WT y KI.**

**a)** Trazos representativos de corrientes sinápticas de ratones WT y KI mostrando mIPSCs glicinérgicos registrados en presencia de TTX (500 nM), bicuculina (10  $\mu$ M), CNQX (40  $\mu$ M) y D-APV (50  $\mu$ M), control y en presencia de 100 mM etanol. **b-c)** Trazos de eventos sinápticos promedios de mIPSC (negro) y etanol (rojo), para WT (b) y KI (c). **d-f)** Los gráficos resumen las propiedades de las mIPSCs en ausencia y presencia de etanol 100 mM. **g-i)** Los gráficos de scatter muestran los parámetros sinápticos de cada una de las neuronas registradas. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (mIPSC: WT (n=25) y KI (n=10); etanol: WT (n=12) y KI (n=8)). n=número de neuronas, ns  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA.

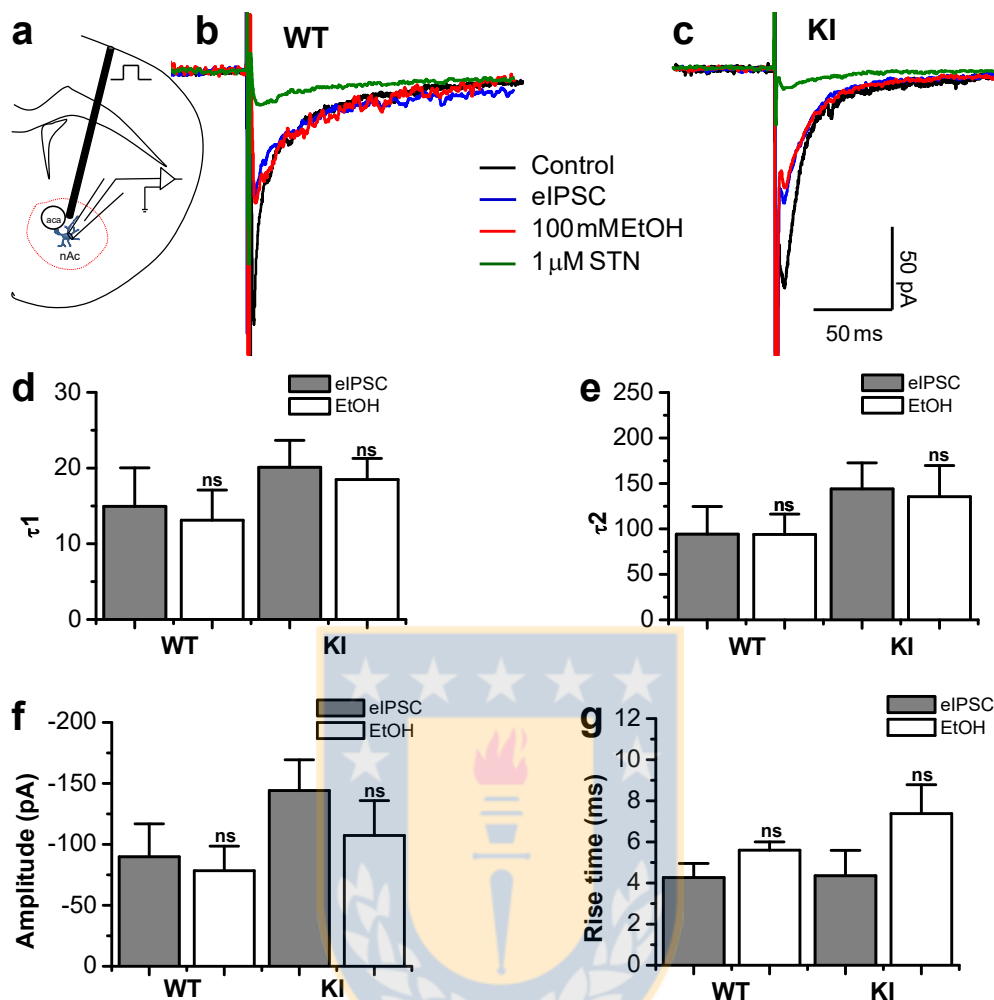


**Figura 29. Efectos de etanol en mIPSCs de MSNs D1 de nAc.**

**a)** Trazos representativos de corrientes sinápticas de MSNs D1 mostrando mIPSCs registrados en presencia de TTX (500 nM), bicuculina (10  $\mu$ M), CNQX (40  $\mu$ M) y D-APV (50  $\mu$ M), control y durante la aplicación de 100 mM etanol y 1  $\mu$ M STN. **b)** Trazo de evento sináptico promedio de mIPSC control (negro) y etanol (rojo). **c-f)** Los gráficos resumen las propiedades de las mIPSCs en ausencia y presencia de etanol. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n=11 neuronas para control; 12 para Etanol). ns  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA.

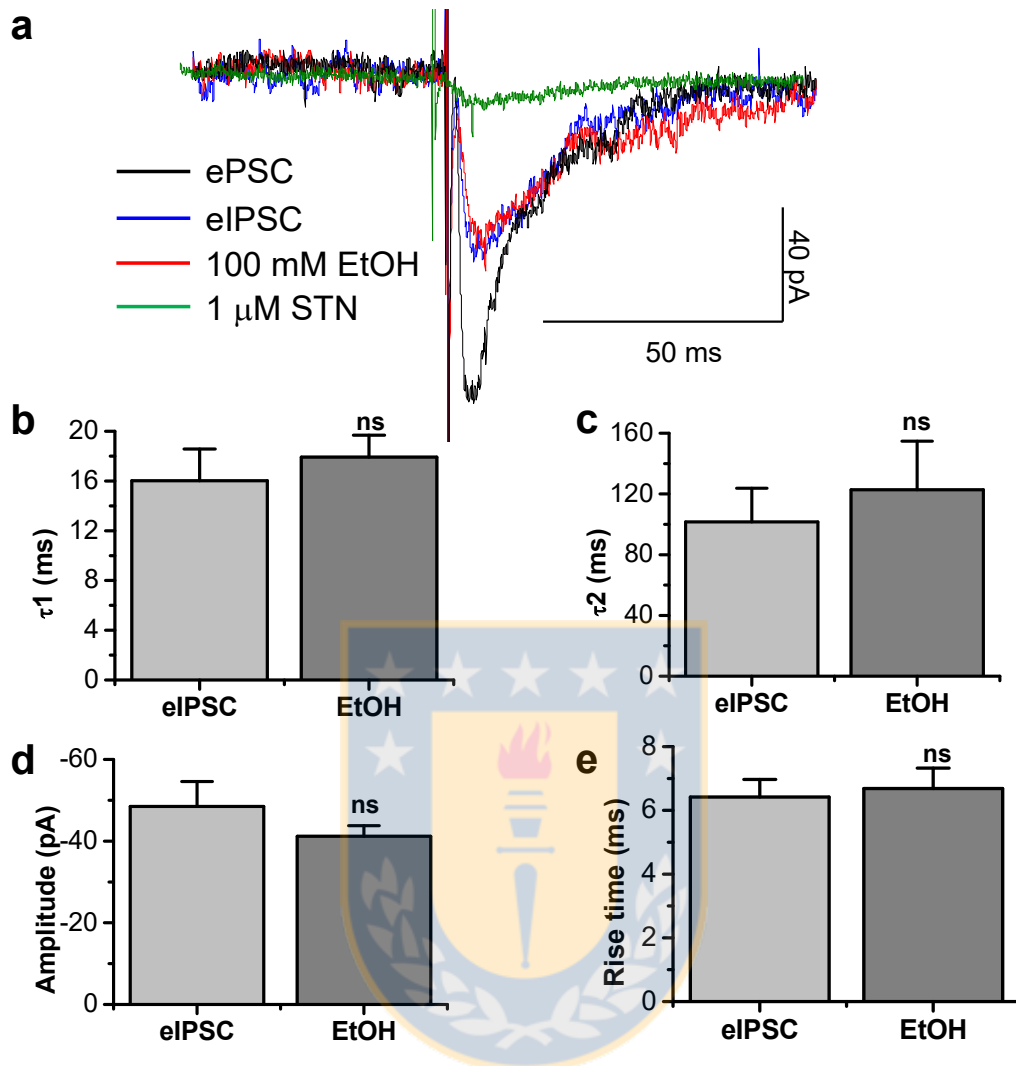


De otra manera, usando la técnica de evocación eléctrica de IPSCs, las MSNs fueron estimuladas mediante un electrodo ubicado cerca del área de registro, a través de un pulso de una amplitud de 10  $\mu$ A de intensidad y 0.5 ms de duración (Figura 30a). Se obtuvo que tanto en neuronas WT como en KI, no hubo diferencias en los parámetros de eIPSC (Figura 30b-c). Los datos mostraron que las constantes de decaimiento 1 (WT:  $15 \pm 5$  ms versus  $13 \pm 4$  ms, n=6; KI:  $20 \pm 4$  ms versus  $18 \pm 3$  ms, n=6) y 2 (WT:  $94 \pm 30$  ms versus  $94 \pm 22$  ms, n=6; KI:  $144 \pm 29$  ms versus  $136 \pm 34$  ms, n=6) no variaron en presencia de 100 mM etanol (Figura 34d-e), tampoco lo hicieron la amplitud (WT:  $90 \pm 27$  pA versus  $78 \pm 20$  pA, n=6; KI:  $144 \pm 25$  pA versus  $107 \pm 29$  pA, n=6) (Figura 30f) y el tiempo de subida (WT:  $4 \pm 1$  ms versus  $4 \pm 1$  ms, n=6; KI:  $6 \pm 1$  ms versus  $7 \pm 1$  ms, n=6) (Figura 30g) del eIPSCs. De la misma forma, en registros de corrientes sinápticas evocadas en MSNs D1, no se observaron diferencias con etanol (Figura 31a). Por ejemplo, las constantes de decaimiento 1 ( $16 \pm 4$  ms versus  $18 \pm 2$  ms, n=7) (Figura 31b) y 2 ( $102 \pm 22$  ms versus  $122 \pm 32$  ms, n=7) (Figura 31c), la amplitud ( $48 \pm 6$  pA versus  $41 \pm 3$  pA, n=7) (Figura 31d) y el tiempo de subida ( $6 \pm 1$  ms versus  $7 \pm 1$  ms, n=7) (Figura 31e), no variaron significativamente, siendo similares en las condiciones controles y con etanol 100 mM. Además, todas las eIPSCs fueron sensibles a estriquina (Figura 30b-c y Figura 31a). Estos datos sugirieron la presencia de IPSCs glicinérgicos insensibles a etanol en nAc. Por lo tanto, en la actividad fásica neuronal, etanol no afectaría a R-Gli. Es por ello que el paso siguiente fue analizar las corrientes tónicas inhibitorias de glicina.



**Figura 30. Efectos de etanol en corrientes glicinérgicas eléctricamente evocadas en nAc WT y KI.**

**a)** El esquema muestra área de estimulación eléctrica en nAc para activar una corriente sináptica. **b-c)** Trazos representativos de corrientes postsinápticas eléctricamente evocadas en ausencia (ePSCs negro) y presencia de bicuculina (10  $\mu$ M), CNQX (40  $\mu$ M) y D-APV (50  $\mu$ M) (eIPSCs, azul), más la aplicación de 100 mM etanol (Rojo) y 1  $\mu$ M STN (verde) en neuronas WT (b) y KI (c). **d-g)** Gráficos resumen los parámetros de las eIPSCs en ausencia y presencia de etanol 100 mM en MSNs WT y KI de nAc. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n=6 neuronas WT y KI). ns  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA.



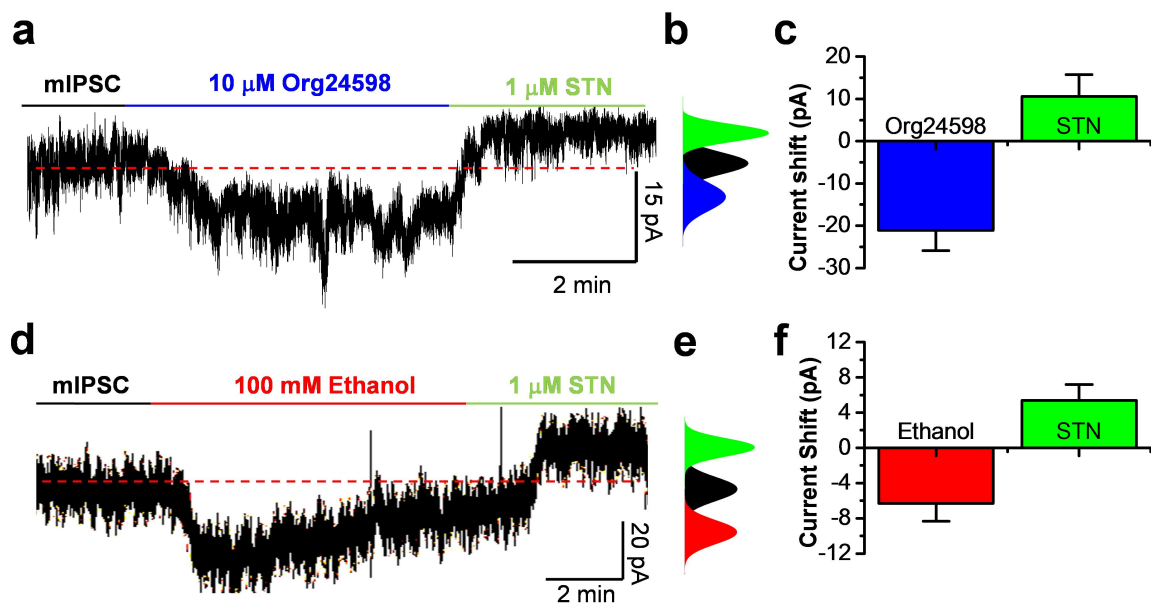
**Figura 31. Efectos de etanol en corrientes glicinérgicas eléctricamente evocadas en MSNs D1.**

**a)** Trazos representativos de corrientes postsinápticas eléctricamente evocadas en ausencia (ePSC, negro) y presencia de bicuculina (10  $\mu$ M), CNQX (40  $\mu$ M) y D-APV (50  $\mu$ M) (eIPSCs, azul), más la aplicación de 100 mM etanol (Rojo) y 1  $\mu$ M STN (verde) en MSNs D1. **b-e)** Gráficos resumen los parámetros de las eIPSCs en ausencia y presencia de etanol 100 mM en MSNs D1 de nAc. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (n=7 neuronas). ns  $p > 0.05$ , One-Way ANOVA.

## **2.8 Evaluación de corrientes tónicas en núcleo accumbens de WT, KI y D1-GFP.**

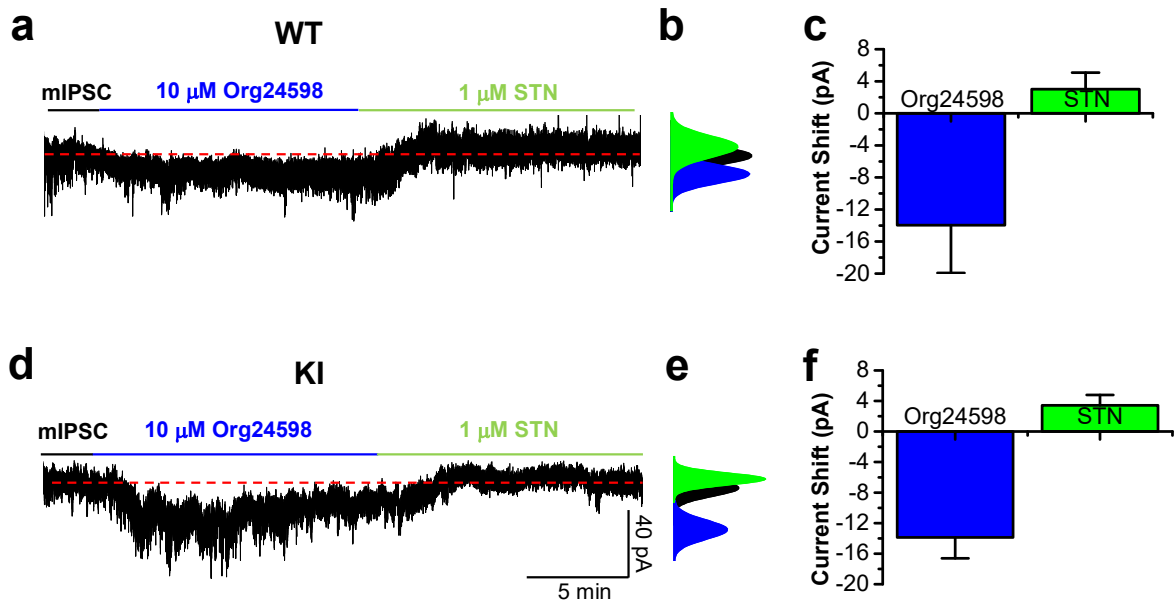
Reportes recientes han demostrado la presencia de corrientes tónicas de glicina en OFC, PFC y nucleus de raphe (Badanich et al., 2013; Maguire et al., 2014; Salling and Harrison, 2014), que estarían producidas por receptores de glicina no sinápticos. Es por ello, que los datos encontrados en neuronas disociadas, nos sugieren la presencia de estos receptores en neuronas accumbales (MSNs). Los primeros datos, adquiridos a través de dot blot, mostraron la presencia del transportador de glicina glial (GlyT1) en nAc (Figura 12d), este regularía los niveles basales de glicina en el medio extracelular, manteniéndolos en una concentración aproximada de 4-10  $\mu\text{M}$  (Slaney et al., 2013), los cuales serían suficientes para mantener una modulación tónica de los R-Gli en MSNs de nAc (Bradaia et al., 2004; Gadea and Lopez-Colome, 2001; Harvey and Yee, 2013). Por lo tanto, usando la técnica de patch clamp en rebanadas de cerebro, evaluamos la existencia de corrientes tónicas que podrían ser sensibles a etanol y estricnina. Se determinó el cambio de la corriente basal mediante el aumento (cuando se hizo más negativo) o la inhibición de la corriente de glicina tónica (cuando se hizo más positiva). Así, usando el animal D1-GFP, quisimos determinar si las MSNs D1+ muestran una corriente tónica de glicina. Usando el inhibidor selectivo de la recaptación de glicina glial (Org24598, 10  $\mu\text{M}$ ), se incrementó la concentración basal de glicina en el nAc. Encontramos que Org24598 fue capaz de aumentar la corriente basal ( $-21 \pm 5$  pA, n=5) que a su vez fue bloqueada por STN ( $11 \pm 5$  pA, n=5) (Figura 32a-c). Además, las corrientes

tónicas en MSNs D1+ fueron sensibles a 100 mM etanol. Aumentando la corriente basal a  $-6 \pm 2$  pA (n=9) y siendo inhibida por STN ( $5 \pm 2$  pA, n=9) (Figura 32d-f). Por lo tanto, MSNs D1+ modulan tónicamente la red neuronal inhibitoria en nAc a través de R-Gli. Del mismo modo, encontramos que 10  $\mu$ M Org24598 aumentó la corriente basal en MSNs WT (Figura 33a-c) y KI ( $-14 \pm 6$  pA y  $14 \pm 3$  pA, n=5 y 7, respectivamente) (Figure 33d-f). Este cambio fue inhibido por STN 1  $\mu$ M en neuronas WT y KI ( $3 \pm 2$  pA y  $3 \pm 1$  pA respectivamente) (Figure 33a-f). Por consiguiente, evaluamos la sensibilidad a etanol de MSNs WT y KI. Así, corrientes tónicas de MSNs WT son potenciadas por 100 mM etanol ( $17 \pm 4$  pA, n=6) (Figura 34a). Interesantemente, las corrientes tónicas de neuronas KI fueron resistentes a los efectos de etanol ( $1 \pm 2$  pA, n=10) (Figura 34c). Análisis estadísticos demuestran una diferencia significativa entre neuronas WT y KI ( $***p < 0.001$ , One-way ANOVA) (Figura 34e). De igual manera a MSNs D1, tanto neuronas WT como KI las corrientes tónicas fueron inhibidas por STN (Figura 34). En suma, estos datos sugirieron la presencia de corrientes tónicamente activadas por glicina en nAc, posiblemente mediada por R-Gli compuestos por la subunidad  $\alpha 1$ .



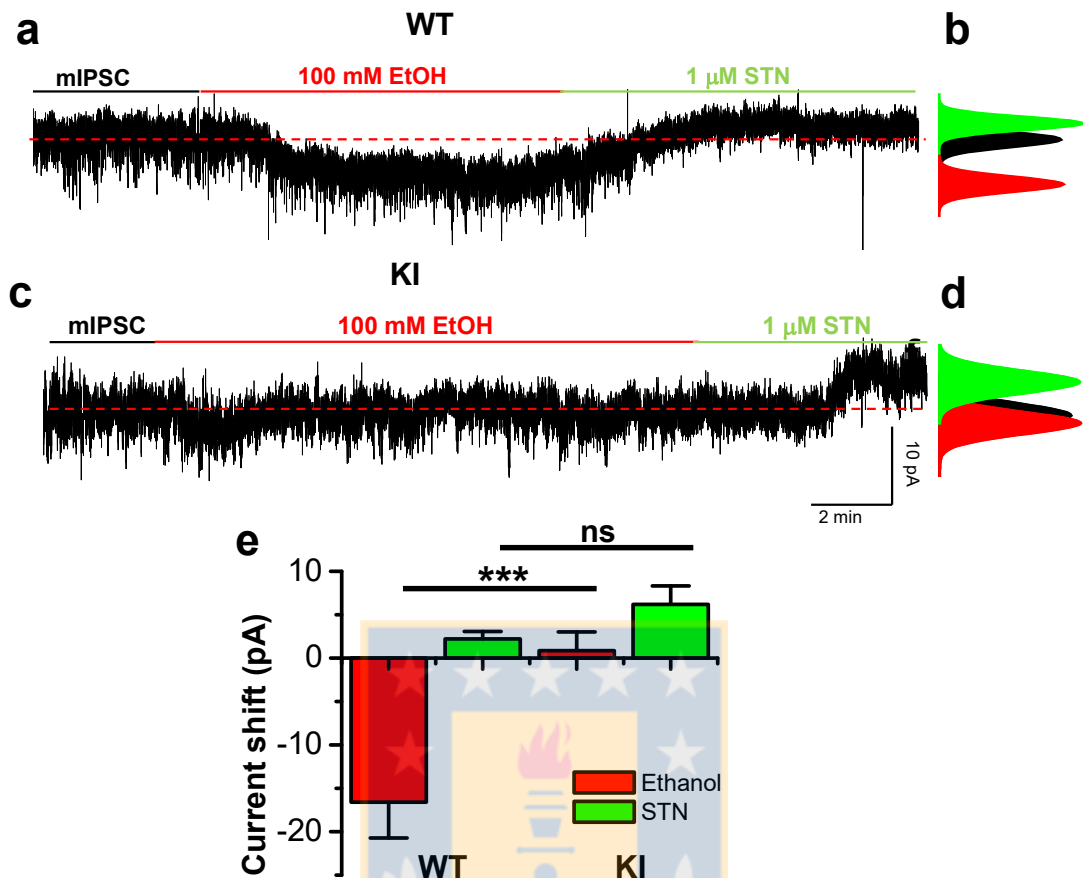
**Figura 32. Presencia de corrientes de glicina tónicas sensibles a estricnina y etanol en MSNs D1+.**

**a)** Trazo electrofisiológico representativo de neurona D1+ en presencia de 10  $\mu\text{M}$  Org 24598 y STN 1  $\mu\text{M}$ . La línea punteada roja indica la línea base (-15 pA). **b)** Histograma muestra el análisis de todos los puntos en 30 segundos del trazo mostrado en a). **c)** Gráfico muestra promedio de respuesta de las neuronas registradas en presencia de Org24598 y STN. Datos demuestran el aumento de corriente con Org24598 y la inhibición de la corriente tónica por STN. **d)** Trazo representativo de MSN D1+, en presencia de 100 mM etanol y STN 1  $\mu\text{M}$ . La línea punteada roja indica la línea base (-4 pA). **e)** Histograma muestra el análisis de todos los puntos en 30 segundos del trazo mostrado en d). **f)** Gráfico muestra promedio de respuesta de las neuronas registradas, etanol produce un cambio en la corriente (-), mientras que STN la inhibe (+). Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM.  $n=5$  neuronas (Org24598) y  $n=9$  neuronas (etanol).



**Figura 33. Presencia de corrientes tónicas de glicina en MSNs WT y KI de nAc.**

**a)** Trazo representativo de neurona WT en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de Org24598 y STN 1  $\mu\text{M}$ . La línea punteada roja indica la línea base (-5 pA). **b)** Histograma muestra el análisis de todos los puntos en 30 segundos del trazo mostrado en a). **c)** Gráfico muestra promedio de respuesta de las neuronas registradas en presencia de Org24598 y STN, se demuestra el cambio de corriente con Org24598 y la inhibición de la corriente tónica por estriquina. **d)** Trazo representativo de neurona KI, en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de Org24598 y STN 1  $\mu\text{M}$ . La línea punteada roja indica la línea base (0 pA). **e)** Histograma all-point de 30 segundos del trazo mostrado en d). **f)** Gráfico muestra promedio de respuesta de las neuronas registradas, Org24598 aumentó la corriente basal, mientras STN la inhibe. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM.  $n=5$  neuronas WT y  $n=7$  neuronas KI.



**Figura 34. Etanol aumenta corriente tónica de glicina en MSNs WT de nAc.**

**a)** Trazo representativo de neurona WT en presencia de 100 mM etanol y STN 1 μM. La línea punteada roja indica la línea base (0 pA). **b)** Histograma es el análisis de 30 segundos del trazo mostrado en a). **c)** Trazo representativo de neurona KI, en presencia de 100 mM etanol y STN 1 μM. La línea punteada roja indica la línea base (-1 pA). **d)** Histograma es el análisis de 30 segundos del trazo mostrado en d). **e)** Gráfico promedio de neuronas registradas en presencia de etanol y STN, se demuestra un cambio significativo de corriente con etanol en neuronas WT, no en KI. En ambos genotipos se observa la inhibición de la corriente tónica por STN. Los datos representan el promedio ± SEM. n=6 neuronas WT y n=10 neuronas KI. ns p>0.05, \*\*\*p<0.001, One-way ANOVA.



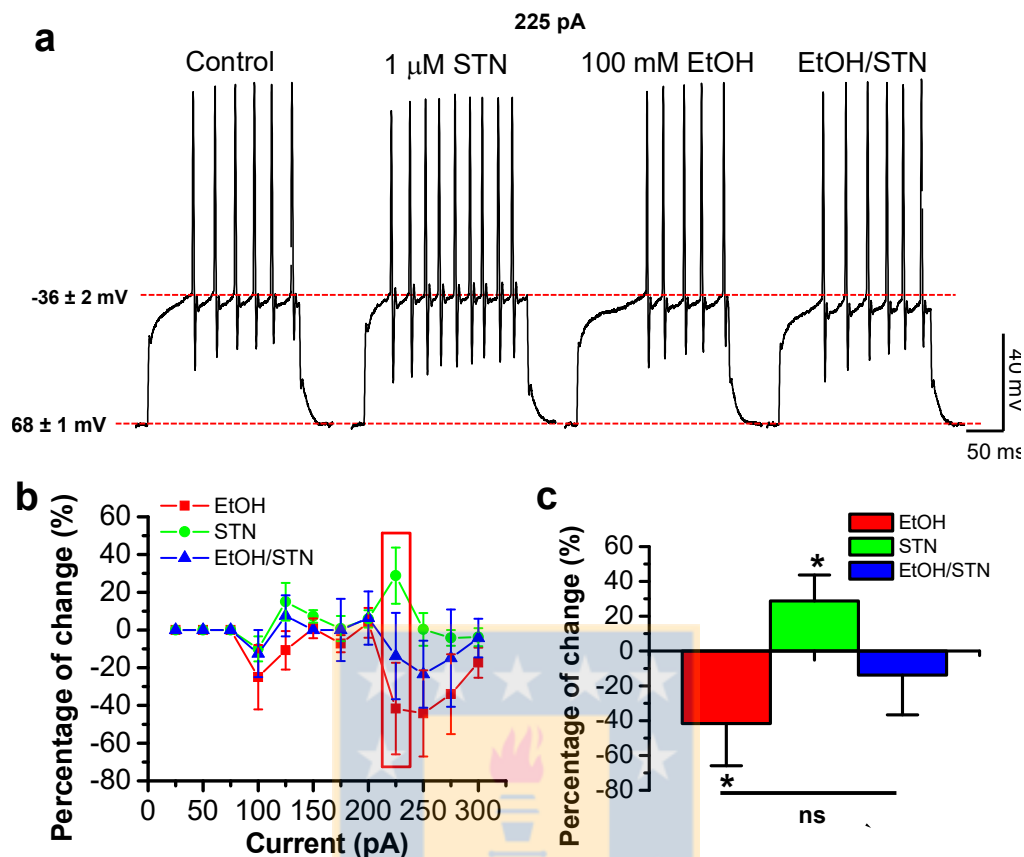
## **2.9 Efectos de la inhibición y potenciación de R-Gli en la excitabilidad neuronal de neuronas accumbales de ratones WT, KI y D1-GFP**

Para determinar los efectos de 100 mM etanol y 1  $\mu$ M STN en la excitabilidad de las neuronas de nAc, potenciales de acción (AP) fueron registrados durante aplicaciones de pulsos de corrientes de (25-300 pA) por 200 ms de duración usando la configuración de Current-clamp.

Así, determinamos si R-Gli en MSNs D1+ son responsables de regular, en parte, la red inhibitoria-excitatoria, usando rebanadas coronales de cerebro de ratones D1-GFP. MSNs D1+ mostraron un potencial de reposo de  $-68 \pm 1$  mV y el potencial umbral para generar un AP fue de  $-36 \pm 2$  mV (Figura 35). Por otro lado, etanol (100 mM) redujo significativamente el porcentaje de potenciales de acción a un  $42 \pm 24$  % (a 225 pA,  $*p < 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 35c). De manera interesante, STN (1  $\mu$ M) los incrementó significativamente en un  $29 \pm 15$  % ( $*p < 0.05$ , One-way ANOVA) y la co-aplicación de ambos (etanol + STN) bloqueó, en parte, los efectos de etanol ( $-14 \pm 23$  %, ns  $p > 0.05$ , One-way ANOVA) (n=7) (Figura 35c). Estos datos sugieren que R-Gli estarían manteniendo el balance inhibitorio-excitatorio en MSNs D1+ del nucleus accumbens. Por consiguiente, evaluamos el rol de la subunidad  $\alpha 1$  de R-Gli en la modulación de los AP en nAc, usando rebanadas de ratones WT y KI.

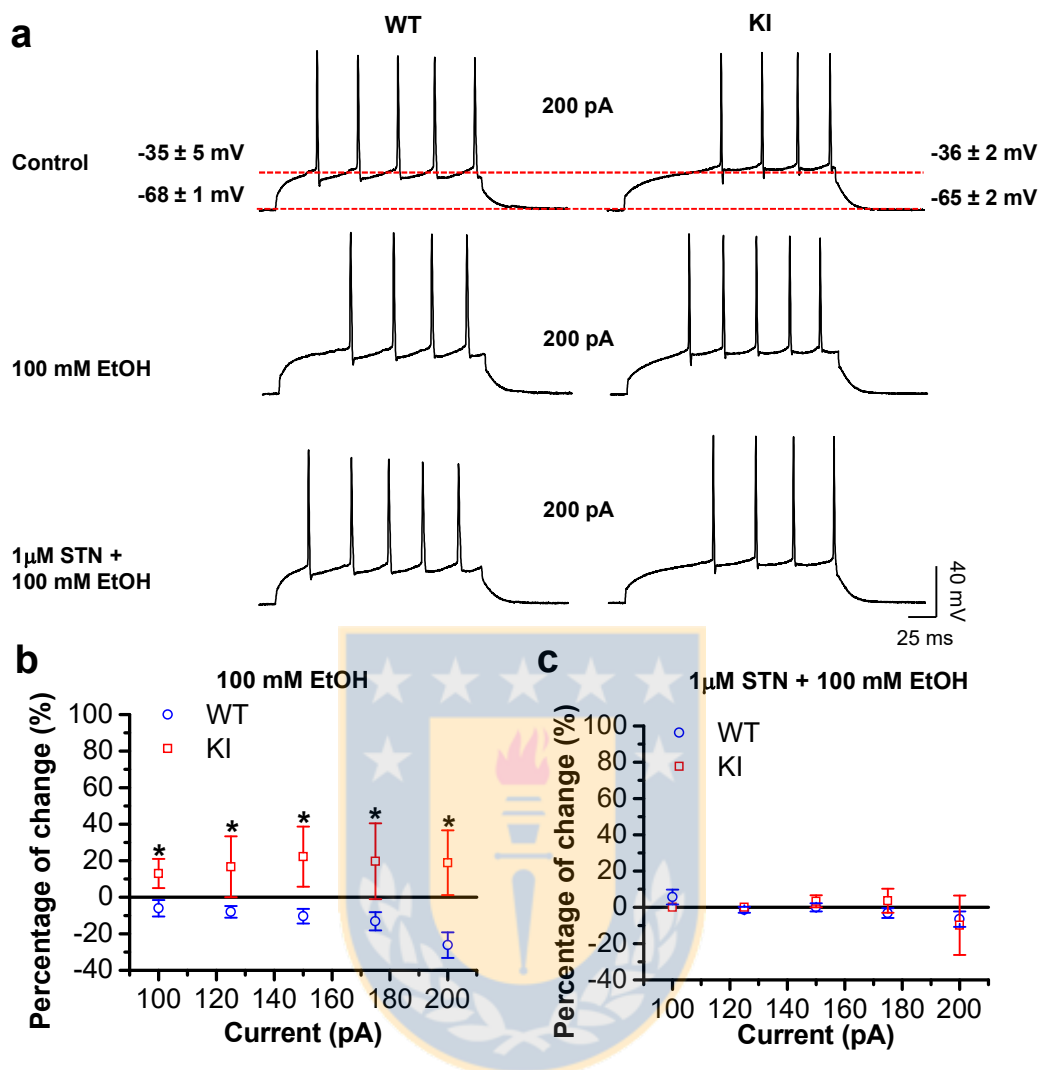
Así, encontramos que tanto neuronas WT como KI mostraron un potencial de reposo de  $-68 \pm 1$  mV y  $-65 \pm 2$  mV, respectivamente. Además, el potencial umbral fue de  $-35 \pm 5$  mV (WT) y  $-36 \pm 2$  mV (KI) (Figura 36). Interesantemente,

etanol redujo significativamente el número de AP en neuronas WT (\* $p < 0.05$ , One-way ANOVA) (Figura 36a y b). Especialmente en el rango de corriente fijada de 100-200 pA, etanol redujo el disparo de AP en un 6, 8, 10, 13 y 26 % del control (\* $p < 0.05$ , One-way ANOVA,  $n = 14$  WT y  $n = 9$  KI) (Figura 36b). Además, encontramos que STN más etanol no alteró el número de AP en WT y en KI. Al comparar los datos entre etanol y etanol/STN en WT se encontraron diferencias significativas a corriente fijada de 150 (\* $p < 0.05$ , One-way ANOVA,  $n = 13$  etanol y  $n = 12$  etanol/STN) y 200 pA (\* $p < 0.05$ , One-way ANOVA,  $n = 20$  etanol y  $n = 12$  etanol/STN) (Figura 36). Estos datos sugieren que STN estaría bloqueando los efectos de etanol en neuronas WT (Figura 36c). De este modo, podemos relacionar los efectos de etanol en la disminución de AP con R-Gli  $\alpha 1$ , debido a que sólo las neuronas WT fueron afectadas. Además, la inhibición de R-Gli por STN estaría modulando los efectos de etanol en la excitabilidad de MSNs D1+ en nAc.



**Figura 35. Efectos de la inhibición y potenciación de R-Gli en la excitabilidad de MSNs D1+ en nAc.**

**a)** Trazos representativos de potenciales de acción de MSNs D1 en aplicación pulso de corriente fijada de 225 pA, en presencia de 100 mM etanol, 1  $\mu$ M STN y la co-aplicación de ambos. Se observa el voltaje de reposo (-68  $\pm$  1 mV) y de umbral (-36  $\pm$  2 mV). Además, se demuestra que 100 mM etanol baja el número de potenciales de acción, STN aumenta los AP y la co-aplicación de ambos revierte los efectos de etanol. **b)** El gráfico muestra los efectos de etanol (cuadrado rojo), STN (circulo verde) y de etanol más STN (triangulo azul) en los pulsos de corriente inyectados (25-300 pA). **c)** Gráfico resume los efectos de etanol, STN y etanol/STN en AP de MSNs D1+. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM. n=7 neuronas. ns p>0.05, \*\*\*p<0.001, One-way ANOVA.



**Figura 36. Efectos de la inhibición y potenciación de R-Gli en la excitabilidad de la red neuronal en nAc de WT y KI.**

**a)** Trazos representativos de potenciales de acción de neuronas WT y KI con pulso de corriente fijada en 200 pA, en presencia de 100 mM etanol y la co-aplicación de etanol más 1  $\mu$ M STN. Se observa que tanto el voltaje de reposo ( $-68 \pm 1$  mV WT y  $-65 \pm 2$  mV KI) y de umbral ( $-35 \pm 5$  mV WT y  $-36 \pm 2$  mV KI) no varía. Además, se demuestra que 100 mM etanol disminuye los potenciales de acción en WT, no así en KI, y esta disminución es revertida con la co-aplicación

de 1  $\mu$ M STN. **b)** Gráfico muestra la reducción de APs en neuronas WT por 100 mM de etanol a corrientes fijas de 100-200 pA, mientras que neuronas KI fueron resistentes a los efectos de etanol. **c)** Gráfico muestra que la co-aplicación de STN bloquea los efectos de etanol en APs de neuronas WT. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM. n=14 neuronas (WT) y n=9 neuronas (KI). \*p<0.05, One-way ANOVA.



### **Objetivo específico 3: Caracterizar el rol de R-Gli $\alpha 1$ en los efectos sedativos, de consumo y preferencia a etanol en ratones WT y KI.**

Se ha indicado que R-Gli  $\alpha 1$  tendría su función principal y expresión en la médula espinal y tronco encefálico (Eggers and Berger, 2004; Eggers et al., 2000; Mariqueo et al., 2014). Para demostrar esta función de R-Gli  $\alpha 1$ , usamos la prueba de comportamiento LORR con la cual fue posible determinar los efectos de etanol en el control motor y en la sedación en ratones WT y KI. Además, los datos de esta tesis demostraron que R-Gli  $\alpha 1$  no sinápticos presentes en nAc, fueron sensibles a etanol y se expresan preferencialmente en MSNs D1 de nAc, por lo cual podrían modular la liberación de DA y el comportamiento adictivo relacionado al etanol. Por lo tanto, evaluamos la importancia de R-Gli  $\alpha 1$  en este sistema, a través de test de consumo libre y voluntario (Drinking in the Dark) y de preferencia de etanol condicionada a un lugar (Conditioned place preference). De este modo, usando animales WT y KI, pudimos determinar la posible función de R-Gli  $\alpha 1$  en el sistema mesolímbico dopaminérgico.

#### **3.1 Efectos sedativos de etanol en ratones WT y KI.**

Etanol a altas concentraciones actúa como molécula sedativa, debido a que potencia la respuesta inhibitoria del SNC, en áreas relacionadas con el control motor y sedación, como la médula espinal y tronco encefálico. La presencia de R-Gli  $\alpha 1$  en estas áreas nos sugiere un rol principal en estas funciones. Es por ello, que usando la prueba de LORR, determinamos los efectos de altas

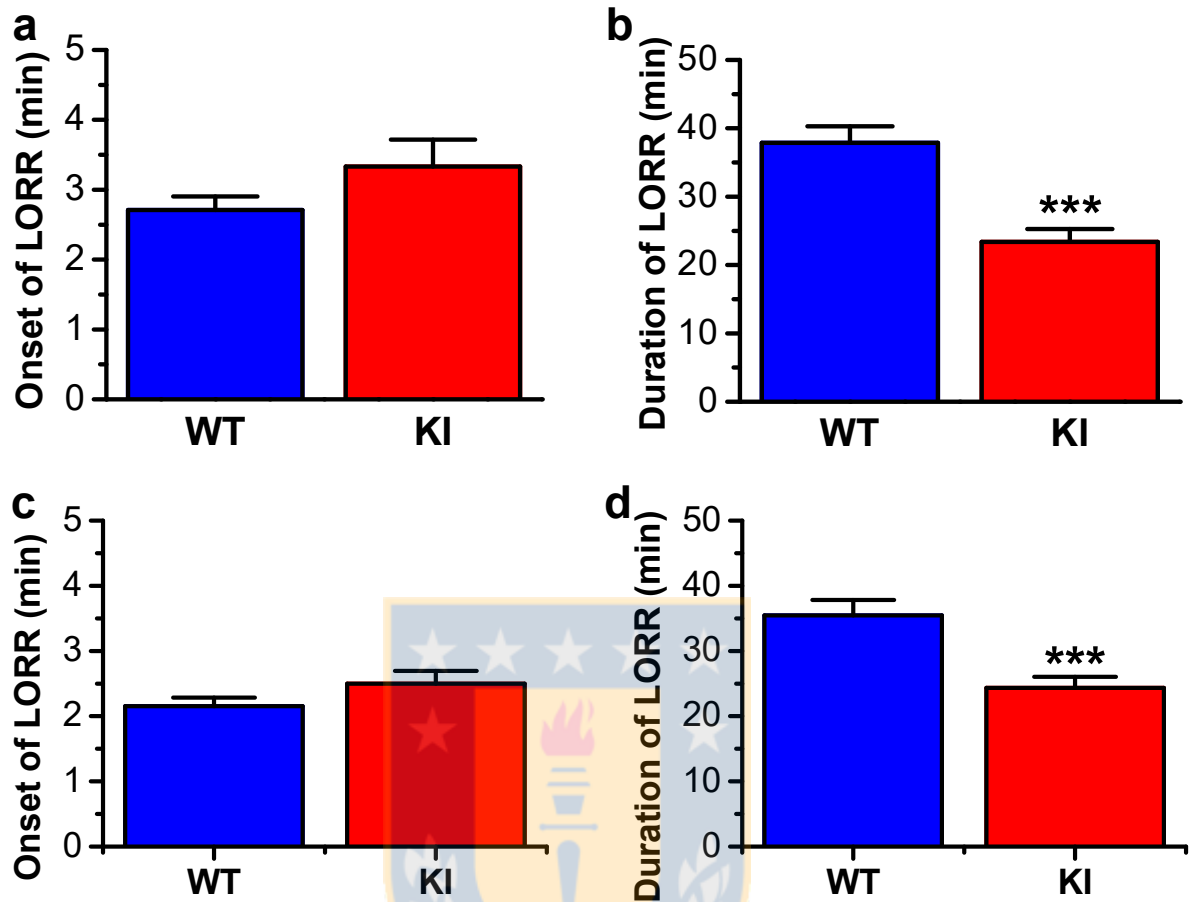
concentraciones de etanol en el control motor y sedación de animales WT y KI. El test LORR, determinó la capacidad del animal para poder reaccionar a los efectos sedativos de etanol y de control motor. Es por ello, que inyectamos i.p. 3.5 g/kg de etanol en ratones WT y KI y evaluamos el tiempo que demoran en quedar sedados y el tiempo que demoran en salir de la sedación. Primero, usamos ratones de tercera generación que consistieron en un híbrido genético entre la cepa 129x1/S1 (12.5%) y C57BL/6J (87.5%). Encontramos que estos animales no presentaron diferencias en el tiempo que demoran en sedarse (WT:  $2.7 \pm 0.2$  min, n=12; KI:  $3.3 \pm 0.4$  min, n=11, ns  $p > 0.05$ , Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 37a), pero sí en el tiempo que toman en recuperarse, siendo menos afectado significativamente, los ratones KI (WT:  $38 \pm 2$  min, n=12; KI:  $23 \pm 2$  min, n=11; \*\*\* $p < 0.001$ , Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 37b). Esta diferencia nos indicó la importante función de R-Gli  $\alpha 1$  en los efectos de etanol, pero podría estar condicionado por el híbrido genético del animal. Es por ello, que fue necesario evaluar estos efectos en ratones de generaciones mayores con un mejor porcentaje de background genético (C57BL/6J). Así, usamos ratones WT y KI de séptima generación que tuvieron un porcentaje de 99.2% de C57BL/6J y 0.8% de 129x1/S1, y volvimos a determinar la importancia de R-Gli  $\alpha 1$  a altas concentraciones de etanol. Interesantemente, encontramos valores similares a los obtenidos en la tercera generación. No encontrando diferencias en el tiempo de caída en sedación (WT:  $2.2 \pm 0.1$  min, n=12; KI:  $2.5 \pm 0.2$  min, n=14, ns  $p > 0.05$ , Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 37c), pero sí en el tiempo de recuperación (WT:  $35 \pm 2$  min, n=12; KI:  $24 \pm 2$  min, n=14; \*\*\* $p < 0.001$ , Two-way ANOVA, Tukey

test) (Figura 37d). Por lo tanto, estos datos apoyan la función de R-Gli  $\alpha 1$  en áreas como médula espinal y tronco encefálico, teniendo un rol importante en el control motor y efectos sedativos de etanol. Por lo tanto, fue necesario evaluar la posible nueva función de R-Gli  $\alpha 1$  en el sistema mesolímbico dopaminérgico.

### **3.2 Determinación de consumo libre a etanol en ratones WT y KI.**

Datos previamente publicados, demuestran que la microdiálisis de glicina directamente en el nAc reduce el consumo y preferencia a etanol en ratas (Molander et al., 2005). Estos datos relacionaron la activación de R-Gli con el consumo de etanol. Por lo tanto, teniendo la herramienta del ratón KI, evaluamos el consumo libre y voluntario a etanol en el ciclo de oscuridad de los ratones, esto debido a que los ratones son más activos durante este ciclo. Se prepararon botellas al 15% etanol y se cambiaron por las de agua, 3 hr después del inicio del ciclo de oscuridad, de esta forma se dejaron por 2 hr (días 1-3) y 4 hrs (4 día), así el animal tuvo la posibilidad de acceder libre y voluntariamente al consumo de etanol (Figura 38a). Encontramos, que animales WT consumieron bajas cantidades de etanol el día 1, mientras que el KI consumió significativamente más (WT:  $1.6 \pm 0.4$  g/kg, n=15; KI:  $5.1 \pm 0.5$  g/kg, n=13; \*\*\*p<0.001, Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 38b). Además, ratones WT consumieron de forma escalonada, aumentando su consumo día a día ( $3.8 \pm 0.3$  g/kg,  $4.0 \pm 0.3$  g/kg y  $5.9 \pm 0.3$  g/kg, para los días 2, 3 y 4 respectivamente) (Figura 38b), teniendo una correlación lineal (R=0.95993; p=0.040), no así los animales KI (R=0.25117; p=0.748) (Figura 38c) y siendo significativo entre los días 1-2 y 1-3 (†††p<0.001, Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 38b).





**Figura 37. Efectos sedativos de etanol en animales WT y KI de 3era y 7ma generación.**

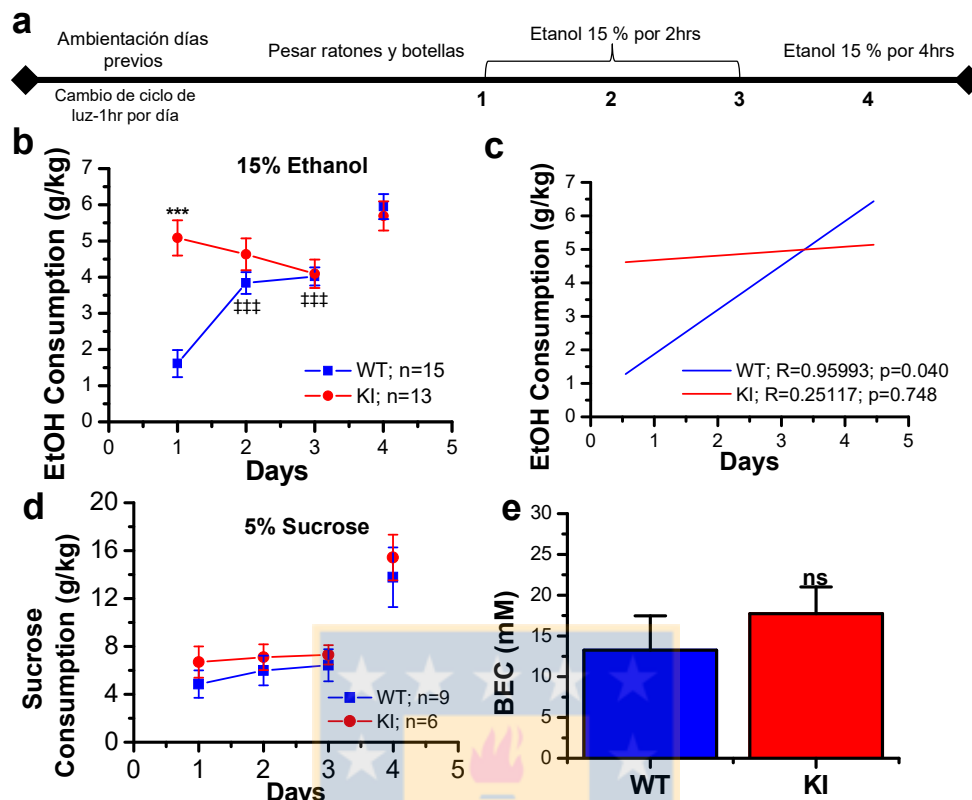
**a)** El gráfico resume el tiempo que demora 3.5 g/kg etanol en tener efectos sedativos en animales WT y KI de tercera generación. **b)** El gráfico resume el tiempo de duración del LORR, en animales WT y KI de tercera generación. **c)** El gráfico resume el tiempo que demora 3.5 g/kg etanol en tener efectos sedativos en animales WT y KI de séptima generación. **d)** El gráfico resume el tiempo de duración del LORR, en animales WT y KI de séptima generación. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM (WT 3era n=12, KI 3era n=11, WT 7ma n=12 y KI 7ma n=14). n= número de animales, \*\*\*p<0.001, Two-way ANOVA.

Por otro lado los ratones KI, consumieron cantidades similares de etanol todos los días, no siendo diferentes con ratones WT los días 2-4 ( $4.6 \pm 0.4$  g/kg,  $4.1 \pm 0.4$  g/kg y  $5.7 \pm 0.4$  g/kg, para los días 2, 3 y 4 respectivamente (ns  $p > 0.05$ , Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 38b). De igual manera, se evaluó el consumo a sucrosa (5%) mostrando similares consumos entre ratones WT y KI (ns  $p > 0.05$ , Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 38d). Además, se evaluó la concentración de etanol en la sangre (BEC) en el día 4. Se encontraron valores similares entre los ratones WT y KI estudiados ( $13.3 \pm 4.2$  mM versus  $17.7 \pm 3.3$  mM, ns  $p > 0.05$ , Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 38e). Estos datos sugieren un importante rol de R-Gli  $\alpha 1$  en el consumo de etanol, ya que el ratón KI empieza consumiendo altas concentraciones de etanol y se mantiene durante los 4 días en similares valores, mientras que el ratón WT presenta un comportamiento ya descrito en literatura, en donde empieza con bajas concentraciones y aumenta día a día (Blednov et al., 2015). Por lo tanto, la posible regulación del consumo de etanol por R-Gli  $\alpha 1$ , también podría regular la preferencia condicionada a etanol.

### **3.3 Determinación de preferencia condicionada a etanol en ratones WT y KI.**

Los datos de esta tesis demostraron que el animal KI tiene menos efectos sedativos de etanol (Figura 37) y consume altas concentraciones de etanol (Figura 38). Por lo tanto, R-Gli  $\alpha 1$  tendría un rol importante en las acciones sedativas y modularía los efectos de etanol. Consecuentemente, evaluamos la preferencia a etanol condicionada a un lugar (CPP) entre animales WT y KI. Para esto, los ratones fueron inyectados i.p. con solución salina 0.9% y 2.0 g/kg etanol (induce que el animal esté bajo los efectos del alcohol) y puestos en cámaras de

condicionamiento con pisos de distintas texturas. Cuando se inyectaba etanol se ponía en el piso denominado Cs+ (grilla grande), mientras que cuando se hacía con solución salina el piso se denominaba Cs- (grilla pequeña) (Figura 39a). Interesantemente, ambos ratones no presentaron diferencias en la sesión de pre condicionamiento que se realizó el día 1 (WT:  $30.2 \pm 0.9$  s/min y  $29.8 \pm 0.9$  s/min, n=11; KI:  $29.8 \pm 1.5$  s/min y  $30.2 \pm 1.5$  s/min, n=12) (Figura 39b). Sin embargo, en la sesión de post condicionamiento, el ratón KI mostró un aumento significativo en la preferencia condicionada a etanol (Cs+) comparado con el mismo ( $35.2 \pm 2.4$  s/min versus  $24.8 \pm 2.4$  s/min, n=12, \*\*p<0.01, Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 39c), mientras que no se observó una preferencia por etanol en ratones WT ( $30.9 \pm 1.8$  s/min versus  $29.1 \pm 1.8$  s/min, n=11, p=0.51, Two-way ANOVA, Tukey test) (Figura 39c). Estos datos apoyan la hipótesis que R-Gli  $\alpha 1$  tiene un rol importante en los efectos de recompensa y de refuerzo a etanol.

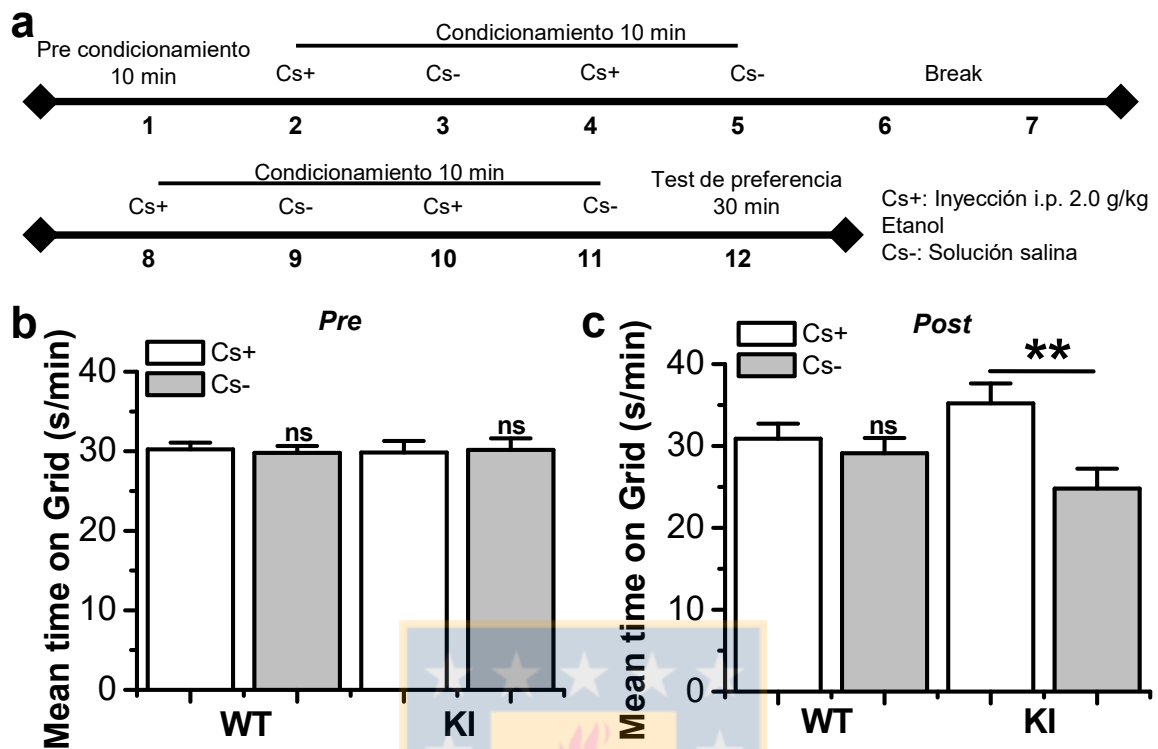


**Figura 38. Consumo libre a etanol en animales WT y KI.**

**a)** Resumen de Protocolo experimental de DID. **b)** El grafico resume los días de consumo libre y voluntario de etanol en el ciclo de oscuridad de ratones WT y KI.

**b)** Se observa que animales WT empiezan consumiendo en bajas cantidades aumentando su consumo día a día, mientras que los KI empiezan consumiendo altas cantidades y se mantienen durante los 4 días. **c)** El gráfico representa la línea de tendencia a la recta, en donde animales WT existe una correlación entre consumo y los días de exposición ( $R^2=0.95993$ ), mientras que en KI no se observa ( $R^2=0.25117$ ).

**d)** El gráfico muestra el consumo a sucrosa, no encontrando diferencias entre WT y KI. **e)** El gráfico muestra la concentración de etanol en la sangre de los ratones WT y KI después del día 4 de consumo. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM, (n=15 WT y n=13 KI). ns  $p>0.05$ ,  $***p<0.001$ ,  $†††p<0.001$ , Two-way ANOVA, Tukey test.



**Figura 39. Preferencia condicionada a etanol en ratones WT y KI.**

**a)** Resumen de Protocolo experimental de CPP. **b)** El gráfico resume el test de preferencia condicionada a un lugar (CPP) en ratones WT y KI en día 1 de pre condicionamiento. Se muestra que los ratones WT y KI no tienen preferencia a los sitios de la cámara. **c)** El gráfico resume el test preferencia condicionada a un lugar (CPP) en ratones WT y KI post condicionamiento por 2 semanas. Se demuestra que ratones KI prefieren estar más tiempo en el lugar donde se inyectaron con 2.0 g/kg etanol (Cs+), mientras que los ratones WT no tienen una preferencia por el sitio. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM, (n=11 animales WT y n=12 animales KI). ns  $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Two-way ANOVA.

## Discusión

En esta tesis se caracterizaron las propiedades bioquímicas y electrofisiológicas de las lisinas 385-386 de la subunidad  $\alpha 1$  del R-Gli en: 1) posibles compensaciones a nivel sináptico en el ratón KI; 2) el sistema mesolímbico dopaminérgico, específicamente en nAc; 3) los efectos de etanol a nivel celular y de comportamiento animal.

### ***La mutación KK385-386AA no causó cambios en la expresión de proteínas sinápticas en el SNC.***

Hiperplexia es un desorden neuromotor que está caracterizado por reflejos de sobresalto exagerados e hipertonia en respuesta a los estímulos auditivos o táctiles repentinos e inesperados. Este trastorno, que es potencialmente mortal, es causado principalmente por mutaciones heredadas en los genes que codifican la subunidad  $\alpha 1$  de R-Gli (GLRA1) (Chung et al., 2010), pero también en los genes para el transportador de glicina presináptico GlyT2 (SLC6A5) (Carta et al., 2012) y la subunidad  $\beta$  de R-Gli (GLRB) (Chung et al., 2013).

Por lo tanto, la modificación de aminoácidos presentes de la subunidad  $\alpha 1$  podría potencialmente modificar la fisiología normal del animal. Por ejemplo, ratones transgénicos para R-Gli  $\alpha 1$  (S246Q) experimentaron cambios en el comportamiento y viabilidad, desarrollando un fenotipo hiperpléxico, sugiriendo que el cambio de este aminoácido puede llevar a compensaciones mayores, que afecta al comportamiento normal del animal (Findlay et al., 2005; Findlay et al., 2003). La presencia de compensaciones se sustenta en la plasticidad neuronal

que posee el SNC, como una forma de restaurar la homeostasis alterada, entre la activación e inhibición del mismo (Turrigiano, 2012). Por ejemplo, ratones KI para R-GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 (H270 y A277) mostraron modificación en la expresión de 6 genes produciendo cambios en la inhibición GABAérgica, mientras que la homologación de estas mutaciones en la subunidad  $\alpha$ 2 de R-GABA<sub>A</sub>, cambio la expresión de 3 genes, no observando cambios pronunciados (Harris et al., 2011).

Estudios previos realizados en el ratón KI, demostraron que no poseen diferencias de sobrevivencia y de reproducción, además de conductuales en estiramiento de extremidades traseras, sobresalto a estímulos sonoros y de campo abierto en ausencia de etanol (Aguayo et al., 2014). Sin embargo, en presencia de etanol, el ratón KI aumentó su estimulación locomotora, fue menos tolerante a los efectos de etanol y experimentó menos efectos sedativos (Aguayo et al., 2014). Todos estos cambios estarían relacionados con la presencia de la mutación KK385-386AA y no a cambios la expresión de proteínas sinápticas en distintas regiones cerebrales. Sin embargo, el aumento de los niveles de las proteínas pre sinápticas; GAD 67 y vGLUT, en cerebelo de ratones KI, podrían estar relacionada con la mutación en R-Gli  $\alpha$ 1, debido a que recientemente se ha reportado la presencia de R-Gli funcionales que estarían regulando la inhibición en nucleus profundos cerebelares, que son importantes para la coordinación motora (Garcia-Alcocer et al., 2008; Glickstein and Doron, 2008; Husson et al., 2014). Sin embargo, estas proteínas tienen funciones fisiológicas opuestas. Es decir, GAD 67 es la enzima que sintetiza el neurotransmisor inhibitorio GABA,

mientras que vGLUT está involucrado en el transporte vesicular del neurotransmisor excitatorio glutamato. Por lo que, estaría ocurriendo una compensación entre la liberación de neurotransmisores excitatorio (glutamato) e inhibitorio (GABA) en el animal KI alcanzando un efecto neto que no estaría generando diferencias conductuales importantes en ausencia de etanol, tal como se observó en el estudio de campo abierto y rotarod (Aguayo et al., 2014). La real implicancia funcional del aumento de estas proteínas quedará para futuros experimentos. En conjunto, **estos datos demuestran que el modelo de animal KI, desarrollado por nuestro laboratorio, tiene un comportamiento normal, sin grandes diferencias motoras y bioquímicas con el ratón WT.** Por lo que, la mutación KK385-386AA en la subunidad  $\alpha 1$  no produce compensaciones neuronales notables, pudiendo atribuir los efectos diferenciales de etanol directamente a la modulación por  $G\beta\gamma$  de R-Gli  $\alpha 1$ .

#### ***R-Gli y el sistema mesolímbico dopaminérgico***

R-Gli ha sido asociado a la regulación del sistema dopaminérgico en nAc, donde es tónicamente activado y regula la liberación de DA (Molander et al., 2005). Glicina, modula los niveles basales de DA, en presencia o ausencia de etanol (Lido et al., 2011). Además, la administración de un inhibidor selectivo para el transportador de glicina glial (GlyT1), aumenta los niveles de glicina extracelular, los cuales elevan la concentración de DA en nAc (Lido et al., 2011) y este incremento bloquea los efectos de etanol en la liberación de DA, llevando a una reducción del consumo de etanol en ratas (Lido et al., 2011). Otros estudios han demostrado que la microinyección de glicina (5  $\mu$ M) en el VTA, selectivamente



baja el consumo de etanol en ratas expuestas a condiciones de consumo crónico de alcohol (Li et al., 2012). Además, se ha reportado la presencia de R-Gli no sinápticos en mPFC (Salling and Harrison, 2014).

Por lo tanto, quisimos responder la interrogante: **¿Cuál es el rol de R-Gli en el sistema mesolímbico dopaminérgico (nAc, VTA y PFC)?** Y finalmente, **¿Son los residuos 385-386 importantes para los efectos de etanol a nivel celular y de comportamiento?**

### ***R-Gli en el nAc.***

A la fecha, se ha relacionado su función con estudios de comportamientos y análisis de microdiálisis de liberación de DA, pero no se ha caracterizado la presencia de R-Gli en nAc. Por lo que, nuestro trabajo entrega nueva información de la función de celular de R-Gli y la posible composición de estos en nAc. Tanto los estudios de PCR, Western Blot e inmunocitoquímicos, demuestran la presencia de R-Gli  $\alpha 1$  en el nAc. Además, de la presencia de receptores en localizaciones sinápticas y no sinápticas, como se ha reportado previamente, en donde agrupaciones de R-Gli  $\alpha 1$  sinápticos se aposicionan con proteínas pre sinápticas como Piccolo, mientras que los no sinápticos se encuentran sin aposicionamiento en neuronas espinales (Mariqueo et al., 2014). Estos datos sugieren que en nAc se tienen todos los requerimientos moleculares para la presencia de corrientes glicinérgicas mediadas por R-Gli. Por lo tanto, se sugirió la presencia de receptores de glicina, principalmente conformados por subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$ . Además, estos receptores generarían actividad sináptica glicinérgica de tipo fásica (IPSCs) y tónica.

### ***Modulación de R-Gli en el nAc.***

El modelo clásico de modulación del sistema mesolímbico dopaminérgico por etanol y drogas involucra a R-GABA<sub>A</sub> como el principal inhibidor neuronal, expresados principalmente en MSNs e interneuronas (Nestler, 2005). Así, la aplicación de DA en rebanadas de nAc preferencialmente modula los R-GABA<sub>A</sub> no sinápticos que median corrientes tónicas inhibitorias, sin efectos significativos en R-GABA<sub>A</sub> sinápticos (Liang et al., 2014). Sin embargo, nuestro trabajo determinó que aproximadamente un 81% de neuronas de nAc WT y un 88% de KI fueron sensibles a glicina (1000  $\mu$ M), con propiedades cinéticas similares a las reportadas para R-Gli  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 1 $\beta$  y  $\alpha$ 2 $\beta$  (Aguayo et al., 2014; Mariqueo et al., 2014; Yevenes et al., 2008). Por consiguiente, no sólo los R-GABA<sub>A</sub> estarían regulando la inhibición de la red en nAc, sino que R-Gli podría tener una acción también. Además, estos receptores, fueron sensibles a etanol y G $\beta$  $\gamma$ , no así en neuronas accumbales de KI. Sugiriendo que los R-Gli serían principalmente  $\alpha$ 1. Sin embargo, el análisis de cada una de las neuronas registradas de KI, mostró una heterogeneidad de respuesta en presencia de etanol y GTP- $\gamma$ -S. Al comparar estos datos con los mostrados en la Tabla 1, sugieren que: 1) las neuronas WT estarían compuestas por R-Gli  $\alpha$ 1 y/o  $\alpha$ 2 $\beta$ ; 2) la presencia de distintas poblaciones de respuestas estaría dada por la presencia de distintas subunidades del R-Gli en MSNs KI. En donde, las neuronas que fueron potenciadas tendrían receptores de tipo  $\alpha$ 2 $\beta$ , las que no fueron sensibles  $\alpha$ 1 KK385-386AA,  $\alpha$ 2 y/o  $\alpha$ 1 KK385-386AA  $\beta$  y las que se inhibieron serían de tipo  $\alpha$ 3 (Tabla 1).

Adicionalmente, análisis de canal único en modalidad outside-out confirmó los efectos de etanol en neuronas WT aumentando la probabilidad de apertura significativamente, en comparación a neuronas KI. Esta modulación no implicó modificación en la conductancia del canal, siendo similares para WT y KI en ausencia y presencia de 10 mM etanol. Estos datos, sugieren que los R-Gli en nAc son de tipo heteroméricos, ya que R-Gli  $\alpha 1$  homoméricos tienen una conductancia aproximada de 90 pS (Yevenes et al., 2010; Yevenes et al., 2008; Yevenes et al., 2003). Por lo que la ausencia de potenciación de las corrientes mediadas por glicina en MSNs KI, sugeriría que los receptores de glicina presentes en nAc estarían compuestos principalmente por  $\alpha 1\beta$ , debido a estos datos son similares a los publicado recientemente por el laboratorio (Aguayo et al., 2014). Adicionalmente, debido a la distribución observada en neuronas KI, los datos de canal único y la existencia de neuronas insensibles a glicina, nos hace pensar que R-Gli se expresa de manera diferencial en las neuronas de nAc, que pueden ser de tipo MSNs D1, D2, interneuronas GABAérgicas y neuronas colinérgicas que median distintas funciones en el sistema mesolímbico dopaminérgico (Hyman et al., 2006). Por ejemplo, las MSNs de tipo D1 (expresan D1Rs y D5Rs) se proyectan **directamente** al VTA, y los de tipo D2R (D2R, D3R y D4R) se proyectan **indirectamente** al VTA a través del pallidum ventral (VP) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011), modulando comportamientos como control del movimiento (Bjorklund and Dunnett, 2007), motivación (Macpherson et al., 2014) y adicción (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005).

La presencia de corrientes de  $Cl^-$  mediadas por glicina en todas las MSNs D1 registradas, además de la mayor sensibilidad a glicina y a bajas concentraciones de etanol sugirió, que **la activación de R-Gli en nAc, podría estar mediando la vía de interacción neuroquímica directa entre MSNs D1 de nAc y neuronas dopaminérgicas A10 del VTA.** Esto pudiese ser capaz de modular directamente la liberación de DA en nAc, como ha sido demostrado en experimentos de microdiálisis de glicina en nAc por Molander and Söderpalm (2005b). La nueva función glicinérgica exclusiva de las MSNs D1, podría estar relacionada con D1R, que son GPCR que activan la proteína  $G\alpha s\beta\gamma$  (Beaulieu and Gainetdinov, 2011), debido a que la activación de  $G\alpha s$  aumenta la sensibilidad a etanol en R-Gli  $\alpha 1$  (Yevenes et al., 2011). Además, estudios no publicados usando la técnica de RiboTag (Sanz et al., 2013; Sanz et al., 2009), demostraron la presencia de alta expresión de mRNA  $\alpha 1$  en MSNs D1. Así, **la sensibilidad a bajas concentraciones etanol posiblemente se deba a la modulación de R-Gli  $\alpha 1$  por proteína G vía activación de DAR D1.**

Evento interesante, ya que la estimulación de DAR D1 por cocaína y anfetamina aumenta la producción de cAMP, lo que conlleva a un incremento de la expresión de dinorfina (Hyman et al., 2006). Dinorfina es un agonista de los receptores opiodes  $\kappa$  que disminuyen la liberación de DA por la neurona dopaminérgica en VTA (Hyman et al., 2006). Así, este mecanismo contribuye en los aspectos emocionales y motivacionales de la abstinencia a drogas, en donde también R-Gli  $\alpha 1$  podría participar.

Sin embargo, es necesario realizar más estudios, como aplicación de agonistas y antagonistas específicos para DAR D1 y D2 para observar si estos modulan de alguna forma la corriente evocada por glicina. Además, también podrían estar relacionados con la presencia de R-Gli sensibles a etanol y  $G\beta\gamma$  en VTA y PFC, lo que sugiere un rol en todo el sistema mesolímbico dopaminérgico, posiblemente regulando el desarrollo del abuso y adicción a etanol (Chau et al., 2010a).

### ***Rol de R-Gli sinápticos en el nAc.***

Hasta el momento, no se ha reportado presencia de input glicinérgico en regiones supra espinales o, en este caso, mesolímbica. Debido a que la regulación inhibitoria se atribuye a los R-GABA<sub>A</sub> que se expresan en gran densidad en el mesencéfalo (Kumar et al., 2009; Kumar et al., 2010; Liang et al., 2014; Luscher et al., 2011; Varley et al., 2011). Sin embargo, la presencia de corrientes inhibitorias glicinérgicas sensibles a estriquina, obtenidos por estudios de mIPSCs y eIPSCs, en nAc fue esperada por los datos obtenidos por Western blot e inmunocitoquímica. Si bien, los mIPSCs e eIPSCs fueron insensibles a etanol, la presencia de eventos glicinérgicos se complementa con la existencia de mIPSCs glicinérgicos en otras áreas como núcleo de raphe y cerebelo (Husson et al., 2014; Maguire et al., 2014), y la regulación de ellos podrían tener un rol no menor en la red nAc-VTA. Sin embargo, para poder demostrar la naturaleza y la función de los R-Gli sinápticos son necesarios más estudios, como co-inmunoprecipitación, inmunocitoquímica y optogenética.

### ***Rol de R-Gli no-sinápticos en el nAc.***

La regulación tónica por receptores no sinápticos de glicina ha tomado importancia recientemente, debido a la caracterización de estas en distintas regiones como mPFC (Salling and Harrison, 2014), médula espinal (Bradaia et al., 2004), núcleo de raphe (Maguire et al., 2014) y OFC (Badanich et al., 2013). Por lo que, tanto datos de dot blot e inmunocitoquímica, que determinaron la presencia de GlyT1 y de agrupaciones de R-Gli  $\alpha$ 1 en regiones no sinápticas, con electrofisiológicos, ayudaron a determinar las corrientes tónicas inhibitorias mediadas por R-Gli. El uso de Org24598, que inhibe la recaptación de glicina por parte de la célula glial, lo que causa un aumento en la concentración de glicina basal en la rebanada (Bradaia et al., 2004), sirvió para caracterizar la importancia de los recaptadores de glicina en mantener una concentración baja del neurotransmisor. Además, que estas corrientes tónicas sean sensibles a etanol en neuronas WT y D1, pero no en KI **sugieren que las corrientes tónicas estarían mayormente mediadas por R-Gli  $\alpha$ 1 no sinápticos sensibles a STN en MSNs D1.**

Este nuevo rol de R-Gli en nAc, podría regular la red neuronal, por lo que: **¿Será posible que la inhibición y potenciación de R-Gli regule la excitabilidad neuronal en nAc?** Por esta problemática, evaluamos la generación de potenciales de acción (AP) en MSNs WT, KI y D1. La disminución del disparo de APs por etanol, estaría dado por la potenciación de las corrientes inhibitorias glicinérgica sólo en neuronas WT, específicamente en MSNs D1, por lo que inhibiría la red. De manera interesante, el bloqueo de este efecto por STN,

demonstraría que los responsables de mantener el balance en la red serían los R-Gli  $\alpha 1$ . Por lo tanto, estos datos sugieren: **1) que R-Gli regularía el balance excitatorio-inhibitorio en nAc; 2) esta regulación estaría siendo llevada a cabo por R-Gli  $\alpha 1$  en MSNs D1.**

***Rol de R-Gli  $\alpha 1$  en los efectos de etanol a nivel de comportamiento.***

Al acoplar los datos bioquímicos y electrofisiológicos obtenidos en los objetivos 1 y 2, apuntan a una nueva función de R-Gli en el sistema mesolímbico dopaminérgico. Específicamente, los datos que muestran exclusividad de respuesta glicinérgica en MSNs D1, corrientes tónicas mediadas por R-Gli y modulación de la excitabilidad en nAc, que involucran directamente a la subunidad  $\alpha 1$ . Sugiriendo, una función más allá de los efectos en directos de etanol en el receptor, sino que a nivel de comportamiento del individuo y/o animal, lo que posiblemente tenga una repercusión en el desarrollo del proceso adictivo a alcohol. De este modo, la modulación de R-Gli  $\alpha 1$  llevaría a **cambios en el comportamiento de sensibilidad a etanol en el ratón KI, que no están asociados a cambios compensatorios mayores de las principales neurotransmisiones.** Lo último ya fue demostrado en el objetivo 1 de esta tesis, por lo que cualquier cambio entre WT y KI estaría relacionado sólo a la mutación KK385-386AA.

Pero, asociar datos celulares a un modelo animal es complejo y se requiere de experimentos que relacionen la acción de la proteína en una región cerebral con cambios en el comportamiento normal (Van den Oever et al., 2012).

Así, la evaluación de los efectos sedativos de etanol, usando altas concentraciones de etanol (3.5 g/kg), se ha relacionado por décadas con la activación de R-Gli (Schmid et al., 1991; Williams et al., 1995; Ye et al., 2009). De esta forma, la potenciación de R-Gli  $\alpha 1$  espinal inhibe al SNC, generando sedación en el animal. Por ello, el estudio de LORR determina la función directa de R-Gli en el comportamiento animal (Ye et al., 2009). Así, tanto los animales KI de tercera, como de séptima generación fueron menos sensibles a los efectos de etanol, mostrando un 30% menos de LORR. Estos datos relacionan directamente la resistencia a los efectos sedativos etanol en animales KI por la presencia de la mutación en R-Gli  $\alpha 1$  espinales (Aguayo et al., 2014) y sirvió de base para los demás estudios. Por lo que, **R-Gli  $\alpha 1$  modularía directamente los efectos sedativos inhibitorios de etanol en el SNC.**

Sin embargo, los comportamientos adictivos son más complejos y requieren de distintos estímulos para poder ser evaluados y relacionarlos con nAc. Reportes previos, demuestran que la microinyección de glicina en nAc y VTA modula el consumo y preferencia a etanol (Li et al., 2012; Molander et al., 2005). Por lo que, la activación de los R-Gli en estas regiones regularía dos comportamientos adictivos. Así, tanto el consumo como la preferencia a drogas, están dados por la motivación a buscar y reforzar consumo de la droga, estímulos que están relacionados con el nAc (Van den Oever et al., 2012).

El test de consumo en la oscuridad (DID), evalúa la motivación y búsqueda de etanol, produciendo un consumo alto de etanol en un tiempo limitado de tiempo (Thiele et al., 2014). Así, que ratones KI tengan un consumo constante y mayor



al WT se podría explicar sugiriendo que R-Gli  $\alpha 1$  y etanol aumentaría la liberación de DA, pero cuando este se potencia por concentraciones inhibitorias de etanol (5-20 mM) y por la activación de D1R, inhibiría directamente a la neurona dopaminérgica A10 en VTA, lo que bloquearía la liberación de DA. Esto no se vería en el KI, en donde se la mutación impediría la regulación en la liberación de DA, por lo que el refuerzo del estímulo (etanol) sería mayor que en WT, ya que necesitaría de mayor consumo para inhibir la red (Figura 40). **Así, R-Gli  $\alpha 1$  tendría un efecto directo en motivar el consumo de etanol.** Este efecto, no está dado por un mayor consumo, ni metabolismo de alcohol por parte del ratón KI (Aguayo et al., 2014).

Finalmente, el test de CPP, al igual que DID, se relaciona con la motivación a un estímulo, pero también al refuerzo y recompensa que genera ese estímulo. Siendo capaz de condicionar su respuesta mediante la locación en donde se inyectaban, por lo cual el animal asocia el entorno al estímulo adictivo (etanol) (Cunningham et al., 2006). De esta manera, se determinó que los ratones KI generaron una mayor preferencia a etanol, sugiriendo que R-Gli  $\alpha 1$  estaría modulando directamente los efectos de preferencia y por ende, de adicción a etanol. Esto se debería **posiblemente a que R-Gli  $\alpha 1$  regularía la liberación de DA desde el VTA al nAc mediante la vía directa por MSNs D1.** De esta forma, el ratón KI no podría regular la liberación de DA, pudiendo consumir grandes cantidades de etanol, además de preferir ser estimulado por etanol.

Resumiendo los datos de esta tesis, más los de bibliografía, podemos sugerir que en ratones WT: **1)** R-Gli  $\alpha 1$  regularía la liberación de DA en nAc,

disminuyendo el consumo y preferencia a etanol (Chau et al., 2010a; Molander et al., 2007; Molander et al., 2005; Molander and Söderpalm, 2005b). **2)** este aumento potenciaría la respuesta de R-Gli  $\alpha 1$  no sinápticos, inhibiendo a MSNs D1, lo que posiblemente inhibiría a la neurona dopaminérgica A10 en VTA. De esta forma, disminuiría la liberación de DA, reduciendo el consumo y preferencia a etanol. **3)** En esta regulación también estarían involucradas las inter neuronas GABAérgicas de VTA, las cuales inhibirían la liberación de DA, previa potenciación de R-Gli (Figura 40). Sin embargo en ratones KI, la regulación inhibitoria de la liberación de DA no se llevaría a cabo, debido a que la mutación en las KK385-386 impediría la inhibición de la neurona dopaminérgica a través del canal potenciado. De esta forma, la neurona A10 liberaría mayor cantidad de DA a distintas regiones como hipocampo, PFC y nAc, reforzando los efectos adictivos de etanol, lo que se ve observado en el aumento del consumo y preferencia condicionada en estos ratones (Figura 40).

Finalmente, aunque los datos indican que R-Gli  $\alpha 1$  tendría un rol significativo en el sistema mesolímbico dopaminérgico, no existen mayores datos de cómo el receptor regularía la liberación de DA y así los efectos de recompensa a etanol. Esta nueva problemática será abordada en futuros trabajos usando el modelo de ratón KI, en conjunto con nuevas herramientas de estudio.

## Conclusión

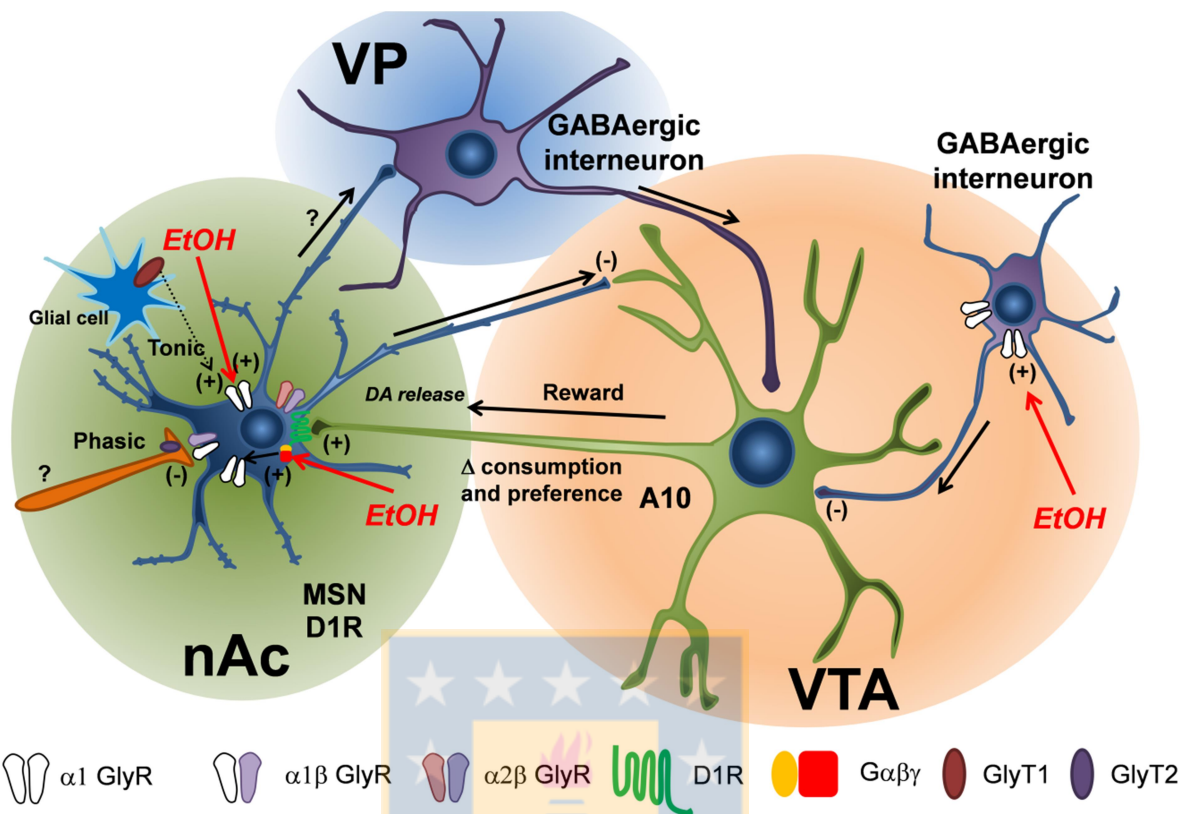
Primero, la determinación de proteínas sinápticas en distintas áreas del SNC, entre ratones WT y KI, demostró niveles relativos similares entre ambos animales. Sugiriendo que **la mutación en ratones KI sería silente en ausencia de etanol**. Además, se evaluó la presencia de R-Gli  $\alpha 1$  en nAc. En este contexto, encontramos que en nAc existen las determinantes moleculares para la presencia de R-Gli  $\alpha 1$  funcionales. Es más, se pudo determinar las localizaciones que estos receptores tendrían en la membrana de MSN (sinápticos y no sinápticos).

Segundo, determinamos que **los R-Gli se expresan en MSNs D1 y serían de tipo  $\alpha 1$  y/o  $\alpha 2\beta$** . Además, los efectos de etanol a bajas concentraciones (1-10 mM), se debería a D1R, el cual modularía positivamente R-Gli  $\alpha 1$ , mediante el dímero  $G\beta\gamma$ . En este contexto, futuros experimentos deberían explicar el rol de D1R en las corrientes glicinérgicas. Por otro lado, el rol de R-Gli sensibles a etanol y  $G\beta\gamma$  en VTA y PFC, sugiere que R-Gli estaría regulando a distintos niveles el sistema mesolímbico dopaminérgico. Adicionalmente, **la contribución de las corrientes sinápticas glicinérgicas no está definida aún**, por lo que sería necesario evaluar de donde proviene el input glicinérgico y cuál sería el rol fisiológico de este. Por el contrario, el hallazgo de corrientes tónicas y de regulación de la excitabilidad mediadas por R-Gli  $\alpha 1$ , nos sugiere **el posible rol modulador que tendría R-Gli  $\alpha 1$  no sináptico en la red dopaminérgica**. Los datos demuestran que R-Gli  $\alpha 1$  no sinápticos son sensibles a etanol y forman

parte importante del sistema mesolímbico dopaminérgico (nAc-VTA-PFC). Para concluir, es necesario realizar experimentos de modulación de D1R, para observar los efectos de estos en las corrientes inhibitorias mediadas por R-Gli  $\alpha 1$ .

Finalmente, los datos electrofisiológicos del objetivo específico 2 se correlacionan con los datos obtenidos en comportamiento del animal KI (objetivo específico 3). En donde, **la mutación de R-Gli  $\alpha 1$  reduce la sedación, eleva el consumo basal y aumenta la preferencia a etanol, los cuales no estaría dado a cambios compensatorios del ratón KI** (Objetivo específico 1). Nuestros datos apuntan, a la regulación de la liberación de DA por medio, primero, de la activación y luego de la potenciación de R-Gli  $\alpha 1$  por etanol. Sin embargo, esta regulación ha quedado pendiente para futuros experimentos. De este modo, el animal KI nos entrega importante información referente a que la subunidad  $\alpha 1$  es la encargada de regular el comportamiento a alcohol.

Como esquema final, se presenta en la Figura 40 el resumen de los datos obtenidos y el posible mecanismo por el cual R-Gli  $\alpha 1$  modularía la respuesta dopaminérgica en la vía nAc-VTA.



**Figura 40. Etanol modula a R-Gli  $\alpha 1$  en MSNs D1 de nAc**

**1)** La expresión de subunidades de R-Gli es de  $\alpha 1 > \alpha 2 \beta > \alpha 1 \beta$ . Se encontró que R-Gli está preferentemente localizado en MSNs D1 nAc, siendo sensible a etanol y  $G\beta\gamma$ . **2)** Se caracterizó la transmisión glicinérgica inhibitoria presente en nAc, mostrando corrientes sinápticas fásicas (IPSC) y corrientes inhibitorias tónicas. Sólo las corrientes tónicas mediadas por R-Gli  $\alpha 1$  fueron sensibles a etanol, lo que regularía el balance excitatorio-inhibitorio en nAc. **3)** Se sugiere una posible regulación de la liberación de DA, por medio de la regulación directa entre MSN D1 y la neurona dopaminérgica A10 en VTA. De esta forma, R-Gli  $\alpha 1$  modularía los efectos adictivos (consumo y preferencia) de etanol.

## **Agradecimientos**

Estudios de doctorado, pasantía en el extranjero y este trabajo fue gracias al aporte de Beca de Doctorado Nacional CONICYT, Beca pasantías doctorales en el extranjero y/o cotutela doctoral en el extranjero, Proyecto NIH AA17875 y Proyecto CONICYT de apoyo al Desarrollo de Proyectos Internacionales de Investigación DPI20140008. Las presentaciones a congresos nacionales e internacionales fueron financiadas por CONICYT y la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción.

Quisiera agradecer al Dr. Luis Aguayo por todos estos años de tutoría, desde pregrado me ha guiado e impulsado el amor por la ciencia que el día de hoy siento. Sin todo su apoyo tanto de carácter formativo científico, como personal, no hubiese podido ni siquiera ingresar al programa de doctorado. Gracias jefe, las palabras faltan para expresar mi gratitud hacia su persona.

A los miembros de la comisión Dr. Francisco Nualart Santander, Dr. Bernardo Morales Muñoz y Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann. Gracias por el aporte que realizaron al proyecto, realización y entrega de esta tesis.

Al Dr. Jorge Fuentealba, por ser mi primer tutor y por entregarme amistad y sabiduría como buen Jedi. Al Dr. Gustavo Moraga, por ser mi primer guía en pregrado y contagiarme de las “mañas” buenas para hacer patch, además del apoyo y amistad. Al Dr. Gonzalo Yevenes, por su apoyo, amistad y constante discusión de resultados y publicaciones. Al Dr. Christian Peters, por su amistad personal y científica, siendo posible discutir todos los temas de contingencia. Al Dr. David Lovinger, por aceptarme en su laboratorio, hacer cálida mi estadía en NIH/NIAAA en EEUU y por la colaboración a mi trabajo de tesis.

Hago extensiva estos agradecimientos a todos los miembros pasados y presentes del Laboratorio de Neurofisiología. Al personal técnico que hace que el laboratorio funcione. A la “salita” en donde muchas buenas ideas y bonitas amistades

salieron. En especial a Laurie Aguayo, que con su alegría y buena disposición hace que se puedan realizar bien las cosas en el laboratorio.

A mi padre, por entregarme las herramientas sacrificando su vida para que su hijo pueda cumplir sus metas, tú me enseñaste a superarse y que todo se puede. Te amo viejo lindo. A mi madre, más allá de las dificultades es justo hacerlo. A mis abuelos. Tata te marchaste hace mucho, pero aún me inspiro con todo lo que lograste y lo que nos entregaste. Emita, mamita, parte de querer ser Doctor es por ti, tú me investías de aquel grado cuando te tenía a mi lado. Gracias mis viejitos!. A mis suegros, por aceptar como yerno a un científico y hacerme sentir como uno más de la familia. Gracias por su apoyo incondicional en todos los pasos que he dado desde que entre en sus vidas.

A mis mujeres. Primero a mi Panchita, mi esposa maravillosa, que me ha apoyado en todo, tu amor incondicional a permitido que pueda sacar este grado. Por culpa de la pasantía, te deje 3 meses sola con Ema y sacaste la tarea adelante. Sin ti no podría realizar nada, eres mi motor y la razón por la que hago las cosas. Este grado es tan tuyo como mío. Mi Emita, eres mi inspiración para hacer las cosas bien, mi felicidad, eres mi pequeña hermosa y espero que te sientas orgullosa de tu papá. Mi Rafaela, falta poco para que te tenga en mis brazos, aun así tu pronta llegada me ha dado las fuerzas para sacar todas las cosas adelante y esforzarme más. Las amo una enormidad mi familia hermosa, cada paso, cada logro lo obtengo gracias a ustedes. A mi Tonito, mi fiel perro, amigo y compañero, te extraño mi pequeño.

Y finalmente, a mis “zorros”. Gracias por tantas tertulias y conversaciones “overnight”. Un salud por ustedes por soportar a un “migrañin”.

## Referencias

- Absalom, N.L., Lewis, T.M., Kaplan, W., Pierce, K.D., and Schofield, P.R. (2003). Role of charged residues in coupling ligand binding and channel activation in the extracellular domain of the glycine receptor. *J Biol Chem* 278, 50151-50157.
- Aguayo, L.G., Castro, P., Mariqueo, T., Munoz, B., Xiong, W., Zhang, L., Lovinger, D.M., and Homanics, G.E. (2014). Altered sedative effects of ethanol in mice with alpha1 glycine receptor subunits that are insensitive to Gbetagamma modulation. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39, 2538-2548.
- Aguayo, L.G., and Pancetti, F.C. (1994). Ethanol Modulation of the  $\gamma$ -Aminobutyric Acid<sub>A</sub>- and glycine-activated Cl<sup>-</sup> current in cultured mouse neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270, 61-69.
- Aguayo, L.G., Tapia, J.C., and Pancetti, F.C. (1996). Potentiation of the glycine-activated Cl<sup>-</sup> current by ethanol in cultured mouse spinal neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 279, 1116-1122.
- Aguayo, L.G., van Zundert, B., Tapia, J.C., Carrasco, M.A., and Alvarez, F.J. (2004). Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development. *Brain research Brain research reviews* 47, 33-45.
- Allan, A.M., Burnett, D., and Harris, R.A. (1991). Ethanol-Induced Changes in Chloride Flux are Mediated by Both GABAA and GABAB Receptors. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 15, 233-237.
- Ávila, A. (2008). Análisis de la interacción y regulación de canales iónicos activados por ligando por GBy (Universidad de Concepción . Facultad de Farmacia: Universidad de Concepción . Facultad de Farmacia).
- Avila, A., Nguyen, L., and Rigo, J.M. (2013). Glycine receptors and brain development. *Front Cell Neurosci* 7, 184.
- Badanich, K.A., Mulholland, P.J., Beckley, J.T., Trantham-Davidson, H., and Woodward, J.J. (2013). Ethanol reduces neuronal excitability of lateral orbitofrontal cortex neurons via a glycine receptor dependent mechanism.



Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 38, 1176-1188.

Baenziger, J.E., and Corringer, P.-J. (2011). 3D structure and allosteric modulation of the transmembrane domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 60, 116-125.

Beaulieu, J.M., and Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews* 63, 182-217.

Bedet, C., Bruusgaard, J.C., Vergo, S., Groth-Pedersen, L., Eimer, S., Triller, A., and Vannier, C. (2006). Regulation of gephyrin assembly and glycine receptor synaptic stability. *The Journal of biological chemistry* 281, 30046-30056.

Bertaccini, E.J., and Trudell, J.R. (2002). Predicting the transmembrane secondary structure of ligand-gated ion channels. *Protein Engineering* 15, 443-453.

Betz, H., Langosch, D., Rundstrom, N., Bormann, J., Kuryatov, A., Kuhse, J., Schmieden, V., Matzenbach, B., and Kirsch, J. (1993). Structure and Biology of Inhibitory Glycine Receptors. *Annals New York Academy of Sciences* 20, 109-115.

Betz, H., and Laube, B. (2006). Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *Journal of Neurochemistry* 97, 1600-1610.

Bjorklund, A., and Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences* 30, 194-202.

Blednov, Y.A., Benavidez, J.M., Black, M., Leiter, C.R., Osterdorff-Kahanek, E., and Harris, R.A. (2015). Glycine receptors containing alpha2 or alpha3 subunits regulate specific ethanol-mediated behaviors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 353, 181-191.

Blednov, Y.A., Benavidez, J.M., Homanics, G.E., and Harris, R.A. (2011). Behavioral Characterization of Knockin Mice with Mutations M287L and Q266I in the Glycine Receptor  $\alpha_1$  Subunit. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 340, 317-329.

Blednov, Y.A., Walker, D., Martinez, M., and Harris, R.A. (2006). Reduced alcohol consumption in mice lacking preprodynorphin. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 40, 73-86.

Borghese, C.M., Blednov, Y.A., Quan, Y., Iyer, S.V., Xiong, W., Mihic, S.J., Zhang, L., Lovinger, D.M., Trudell, J.R., Homanics, G.E., *et al.* (2012). Characterization of two mutations, M287L and Q266I, in the alpha1 glycine receptor subunit that modify sensitivity to alcohols. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 340, 304-316.

Bradaia, A., Schlichter, R., and Trouslard, J. (2004). Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. *The Journal of physiology* 559, 169-186.

Bright, D.P., and Smart, T.G. (2013). Methods for recording and measuring tonic GABAA receptor-mediated inhibition. *Frontiers in neural circuits* 7, 193.

Buckwalter, M.S., Cook, S.A., Davisson, M.T., White, W.F., and Camper, S.A. (1994). A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (*Gla1*) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum Mol Genet* 3, 2025-2030.

Burgos, C.F., Munoz, B., Guzman, L., and Aguayo, L.G. (2015). Ethanol effects on glycinergic transmission: From molecular pharmacology to behavior responses. *Pharmacological research* 101, 18-29.

Carta, E., Chung, S.K., James, V.M., Robinson, A., Gill, J.L., Remy, N., Vanbellinhen, J.F., Drew, C.J., Cagdas, S., Cameron, D., *et al.* (2012). Mutations in the GlyT2 gene (*SLC6A5*) are a second major cause of startle disease. *The Journal of biological chemistry* 287, 28975-28985.

Cascio, M. (2004). Structure and Function of the Glycine Receptor and Related Nicotinicoid Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 279, 19383-19386.

Cascio, M. (2006). Modulating Inhibitory Ligand-Gated Ion Channels. *The AAPS Journal* 8, 353-361.

Corringer, P.J., Baaden, M., Bocquet, N., Delarue, M., Dufresne, V., Nury, H., Prevost, M., and Van Renterghem, C. (2009). Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues. *The Journal of Physiology* 588, 565-572.

Crawford, D.K., Perkins, D.I., Trudell, J.R., Bertaccini, E.J., Davies, D.L., and Alkana, R.L. (2008). Roles for Loop 2 Residues of  $\alpha 1$  Glycine Receptors in Agonist Activation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27698-27706.

Crawford, D.K., Trudell, J.R., Bertaccini, E.J., Li, K., Davies, D.L., and Alkana, R.L. (2007). Evidence that ethanol acts on a target in Loop 2 of the extracellular domain of  $\alpha 1$  glycine receptors. *Journal of neurochemistry* 102, 2097-2109.

Cunningham, C.L., Gremel, C.M., and Groblewski, P.A. (2006). Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc* 1, 1662-1670.

Chandra, D., Werner, D.F., Liang, J., Suryanarayanan, A., Harrison, N.L., Spigelman, I., Olsen, R.W., and Homanics, G.E. (2007). Normal Acute Behavioral Responses to Moderate/High Dose Ethanol in GABA<sub>A</sub> Receptor  $\alpha 4$  Subunit Knockout Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32, 10-18.

Chang, Q., and Martin, L.J. (2011). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 2815-2827.

Chau, P., Hoifodt-Lido, H., Lof, E., Soderpalm, B., and Ericson, M. (2010a). Glycine receptors in the nucleus accumbens involved in the ethanol intake-reducing effect of acamprosate. *Alcoholism, clinical and experimental research* 34, 39-45.

Chau, P., Stomberg, R., Fagerberg, A., Soderpalm, B., and Ericson, M. (2010b). Glycine receptors involved in acamprosate's modulation of accumbal dopamine levels: an in vivo microdialysis study. *Alcoholism, clinical and experimental research* 34, 32-38.

Chen, X., and Johnston, D. (2005). Constitutively active G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 25, 3787-3792.

Chung, S.K., Bode, A., Cushion, T.D., Thomas, R.H., Hunt, C., Wood, S.E., Pickrell, W.O., Drew, C.J., Yamashita, S., Shiang, R., *et al.* (2013). GLRB is the third major gene of effect in hyperekplexia. *Hum Mol Genet* 22, 927-940.

Chung, S.K., Vanbellinghen, J.F., Mullins, J.G., Robinson, A., Hantke, J., Hammond, C.L., Gilbert, D.F., Freilinger, M., Ryan, M., Kruer, M.C., *et al.* (2010). Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 9612-9620.

Davies, D.L., Crawford, D.K., Trudell, J.R., Mihic, S.J., and Alkana, R.L. (2004). Multiple sites of ethanol action in alpha1 and alpha2 glycine receptors suggested by sensitivity to pressure antagonism. *Journal of Neurochemistry* 89, 1175-1185.

Davies, D.L., Trudell, J.R., Mihic, S.J., Crawford, D.K., and Alkana, R.L. (2003). Ethanol potentiation of glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes antagonized by increased atmospheric pressure. *Alcoholism, clinical and experimental research* 27, 743-755.

Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 137, 75-114.

Dopico, A.M., and Lovinger, D.M. (2009). Acute alcohol action and desensitization of ligand-gated ion channels. *Pharmacological reviews* 61, 98-114.

Durcan, M.J., and Lister, R.G. (1989). Reduction of the intoxicating effects of ethanol by drugs acting at the benzodiazepine-GABA receptor complex. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 32, 667-670.

Dworakowska, B., and Dolowy, K. (2000). Ion channels-related diseases. *Acta Biochim Pol* 47, 685-703.

Eggers, E.D., and Berger, A.J. (2004). Mechanisms for the modulation of native glycine receptor channels by ethanol. *Journal of neurophysiology* 91, 2685-2695.

Eggers, E.D., O'Brien, J.A., and Berger, A.J. (2000). Developmental changes in the modulation of synaptic glycine receptors by ethanol. *Journal of neurophysiology* 84, 2409-2416.

Eichler, S.A., Kirischuk, S., Juttner, R., Schaefermeier, P.K., Legendre, P., Lehmann, T.N., Gloveli, T., Grantyn, R., and Meier, J.C. (2008). Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J Cell Mol Med* 12, 2848-2866.

Engle, S.E., McIntosh, J.M., and Drenan, R.M. (2015). Nicotine and ethanol cooperate to enhance ventral tegmental area AMPA receptor function via alpha6-containing nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 91, 13-22.

Feigenspan, A., and Bormann, J. (1994). Modulation of GABAC receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *The Journal of physiology* 481 ( Pt 2), 325-330.

Findlay, G.S., Harris, R.A., and Blednov, Y.A. (2005). Male transgenic glycine receptor alpha1 (S267Q) mutant mice display a hyperekplexia-like increase in acoustic startle responses. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 82, 215-222.

Findlay, G.S., Phelan, R., Roberts, M.T., Homanics, G.E., Bergeson, S.E., Lopreato, G.F., Mihic, S.J., Blednov, Y.A., and Harris, R.A. (2003). Glycine receptor knock-in mice and hyperekplexia-like phenotypes: comparisons with the null mutant. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 8051-8059.

Fischer, H., Liu, D.M., Lee, A., Harries, J.C., and Adams, D.J. (2005). Selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel subunits by G-protein subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 3571-3577.

Ford, C.E. (1998). Molecular Basis for Interactions of G Protein Subunits with Effectors. *Science (New York, NY)* 280, 1271-1274.

Forman, S.A., and Miller, K.W. (2011). Anesthetic sites and allosteric mechanisms of action on Cys-loop ligand-gated ion channels. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie* 58, 191-205.

Gadea, A., and Lopez-Colome, A.M. (2001). Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA III. Glycine transporters. *Journal of neuroscience research* 64, 218-222.

Garcia-Alcocer, G., Mejia, C., Berumen, L.C., Miledi, R., and Martinez-Torres, A. (2008). Developmental expression of glycine receptor subunits in rat cerebellum. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26, 319-322.

Glickstein, M., and Doron, K. (2008). Cerebellum: connections and functions. *Cerebellum* (London, England) 7, 589-594.

Guzman, L., Moraga-Cid, G., Avila, A., Figueroa, M., Yevenes, G.E., Fuentealba, J., and Aguayo, L.G. (2009). Blockade of Ethanol-Induced Potentiation of Glycine Receptors by a Peptide That Interferes with G Binding. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331, 933-939.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.

Harris, R.A. (1999). Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 23, 1563-1570.

Harris, R.A., Osterndorff-Kahanek, E., Ponomarev, I., Homanics, G.E., and Blednov, Y.A. (2011). Testing the silence of mutations: Transcriptomic and behavioral studies of GABA(A) receptor alpha1 and alpha2 subunit knock-in mice. *Neuroscience letters* 488, 31-35.

Harvey, R.J., Depner, U.B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T.G., Harvey, K., Schutz, B., Abo-Salem, O.M., *et al.* (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* (New York, NY) 304, 884-887.

Harvey, R.J., and Yee, B.K. (2013). Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain. *Nature reviews Drug discovery* 12, 866-885.

Huang, C., Hepler, J.R., Chen, L.T., Gilman, A.G., Anderson, R.G., and Mumby, S.M. (1997). Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Molecular biology of the cell* 8, 2365-2378.

Husson, Z., Rousseau, C.V., Broll, I., Zeilhofer, H.U., and Dieudonne, S. (2014). Differential GABAergic and glycinergic inputs of inhibitory interneurons and Purkinje cells to principal cells of the cerebellar nuclei. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 9418-9431.

- Hyman, S.E., Malenka, R.C., and Nestler, E.J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual review of neuroscience* 29, 565-598.
- Jia, F., Chandra, D., Homanics, G.E., and Harrison, N.L. (2008). Ethanol modulates synaptic and extrasynaptic GABAA receptors in the thalamus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326, 475-482.
- Jia, F., Pignataro, L., and Harrison, N.L. (2007). GABAA receptors in the thalamus:  $\alpha 4$  subunit expression and alcohol sensitivity. *Alcohol* 41, 177-185.
- Jonsson, S., Adermark, L., Ericson, M., and Soderpalm, B. (2014). The involvement of accumbal glycine receptors in the dopamine-elevating effects of addictive drugs. *Neuropharmacology* 82, 69-75.
- Jun, S.B., Cuzon Carlson, V., Ikeda, S., and Lovinger, D. (2011). Vibrodissociation of neurons from rodent brain slices to study synaptic transmission and image presynaptic terminals. *J Vis Exp* doi: 10.3791/2752.
- Kayakabe, M., Kakizaki, T., Kaneko, R., Sasaki, A., Nakazato, Y., Shibasaki, K., Ishizaki, Y., Saito, H., Suzuki, N., Furuya, N., *et al.* (2013). Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter knockout mice. *Front Cell Neurosci* 7, 286.
- Kelley, A.E., and Berridge, K.C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 3306-3311.
- Kitson, S.L. (2007). 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor ligands. *Curr Pharm Des* 13, 2621-2637.
- Koch, M., Kling, C., and Becker, C.M. (1996). Increased startle responses in mice carrying mutations of glycine receptor subunit genes. *Neuroreport* 7, 806-808.
- Krowicki, Z.K., and Kapusta, D.R. (2011). Microinjection of glycine into the hypothalamic paraventricular nucleus produces diuresis, natriuresis, and inhibition of central sympathetic outflow. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 337, 247-255.
- Kumar, S., Porcu, P., Werner, D.F., Matthews, D.B., Diaz-Granados, J.L., Helfand, R.S., and Morrow, A.L. (2009). The role of GABA(A) receptors in the acute and

chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* 205, 529-564.

Kumar, S., Suryanarayanan, A., Boyd, K.N., Comerford, C.E., Lai, M.A., Ren, Q., and Morrow, A.L. (2010). Ethanol reduces GABAA alpha1 subunit receptor surface expression by a protein kinase Cgamma-dependent mechanism in cultured cerebral cortical neurons. *Mol Pharmacol* 77, 793-803.

Laube, B., Maksay, G., Schemm, R., and Betz, H. (2002). Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 519-527.

Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58, 760-793.

Leite, J.F., and Cascio, M. (2001). Structure of ligand-gated ion channels: critical assessment of biochemical data supports novel topology. *Mol Cell Neurosci* 17, 777-792.

Li, J., Nie, H., Bian, W., Dave, V., Janak, P.H., and Ye, J.H. (2012). Microinjection of glycine into the ventral tegmental area selectively decreases ethanol consumption. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 341, 196-204.

Liang, J., Marty, V.N., Mulpuri, Y., Olsen, R.W., and Spigelman, I. (2014). Selective modulation of GABAergic tonic current by dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-dependent rats. *Journal of neurophysiology* 112, 51-60.

Lido, H.H., Ericson, M., Marston, H., and Soderpalm, B. (2011). A role for accumbal glycine receptors in modulation of dopamine release by the glycine transporter-1 inhibitor org25935. *Front Psychiatry* 2, 8.

Lima-Landman, M.T., and Albuquerque, E.X. (1989). Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells. *FEBS Lett* 247, 61-67.

Liu, Q., and Wong-Riley, M.T. (2013). Postnatal development of glycine receptor subunits alpha1, alpha2, alpha3, and beta immunoreactivity in multiple brain stem respiratory-related nuclear groups of the rat. *Brain Res* 1538, 1-16.



- Lobo, I.A., Trudell, J.R., and Harris, R.A. (2006). Accessibility to residues in transmembrane segment four of the glycine receptor. *Neuropharmacology* 50, 174-181.
- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J., and Clapham, D.E. (1987). The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic  $K^+$  channel in heart. *Nature* 325, 321-326.
- Lopez-Corcuera, B., Geerlings, A., and Aragon, C. (2001). Glycine neurotransmitter transporters: an update. *Mol Membr Biol* 18, 13-20.
- Lovinger, D., White, G., and Weight, F. (1989). Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243, 1721-1724.
- Lovinger, D.M., and White, G. (1991). Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine 3 receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. *Molecular Pharmacology* 40, 263-270.
- Lu, Y., and Ye, J.H. (2011). Glycine-activated chloride currents of neurons freshly isolated from the prefrontal cortex of young rats. *Brain Res* 1393, 17-22.
- Luscher, B., Fuchs, T., and Kilpatrick, C.L. (2011). GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70, 385-409.
- Macpherson, T., Morita, M., and Hikida, T. (2014). Striatal direct and indirect pathways control decision-making behavior. *Frontiers in psychology* 5, 1301.
- Maguire, E.P., Mitchell, E.A., Greig, S.J., Corteen, N., Balfour, D.J., Swinny, J.D., Lambert, J.J., and Belelli, D. (2013). Extrasynaptic Glycine Receptors of Rodent Dorsal Raphe Serotonergic Neurons: A Sensitive Target For Ethanol. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*.
- Maguire, E.P., Mitchell, E.A., Greig, S.J., Corteen, N., Balfour, D.J., Swinny, J.D., Lambert, J.J., and Belelli, D. (2014). Extrasynaptic glycine receptors of rodent dorsal raphe serotonergic neurons: a sensitive target for ethanol. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39, 1232-1244.
- Maksay, G. (2009). Ligand-gated pentameric ion channels, from binding to gating. *Current Molecular Pharmacology* 2, 253-262.

- Maksay, G., Laube, B., and Betz, H. (2001). Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids. *Neuropharmacology* 41, 369-376.
- Maric, H.M., Mukherjee, J., Tretter, V., Moss, S.J., and Schindelin, H. (2011). Gephyrin-mediated gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor clustering relies on a common binding site. *The Journal of biological chemistry* 286, 42105-42114.
- Mariqueo, T.A., Agurto, A., Munoz, B., San Martin, L., Coronado, C., Fernandez-Perez, E.J., Murath, P., Sanchez, A., Homanics, G.E., and Aguayo, L.G. (2014). Effects of ethanol on glycinergic synaptic currents in mouse spinal cord neurons. *Journal of neurophysiology* 111, 1940-1948.
- Mascia, M.P. (2000). Specific binding sites for alcohols and anesthetics on ligand-gated ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 9305-9310.
- Mascia, M.P., Mihic, S.J., Valenzuela, C.F., Schofield, P.R., and Harris, R.A. (1996). A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine-sensitive glycine receptors. *Mol Pharmacol* 50, 402-406.
- Mascia, M.P., Wick, M.J., Martinez, L.D., and Harris, R.A. (1998). Enhancement of glycine receptor function by ethanol: role of phosphorylation. *Br J Pharmacol* 125, 263-270.
- McCracken, L.M., Trudell, J.R., Goldstein, B.E., Harris, R.A., and Mihic, S.J. (2010). Zinc enhances ethanol modulation of the alpha1 glycine receptor. *Neuropharmacology* 58, 676-681.
- McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 551-577.
- McKeon, A., Frye, M.A., and Delanty, N. (2008). The alcohol withdrawal syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 79, 854-862.
- Mihalek, R.M., Bowers, B.J., Wehner, J.M., Kralic, J.E., VanDoren, M.J., Morrow, A.L., and Homanics, G.E. (2001). GABA(A)-receptor delta subunit knockout mice have multiple defects in behavioral responses to ethanol. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 25, 1708-1718.

- Mihic, S.J. (1999). Acute effects of ethanol on GABA<sub>A</sub> and glycine receptor function. *Neurochemistry International* 35, 115-123.
- Mihic, S.J., Ye, Q., Wick, M.J., Koltchine, V.V., Krasowski, M.D., Finn, S.E., Mascia, M.P., Valenzuela, C.F., Hanson, K.K., Greenblatt, E.P., *et al.* (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 389, 385-389.
- Milner, P.M. (1991). Brain-stimulation reward: a review. *Canadian journal of psychology* 45, 1-36.
- Miller, C. (2000). Ion channels: doing hard chemistry with hard ions. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 148-151.
- Molander, A., Lido, H.H., Lof, E., Ericson, M., and Soderpalm, B. (2007). The glycine reuptake inhibitor Org 25935 decreases ethanol intake and preference in male wistar rats. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 42, 11-18.
- Molander, A., Löf, E., Stomberg, R., Ericson, M., and Söderpalm, B. (2005). Involvement of Accumbal Glycine Receptors in the Regulation of Voluntary Ethanol Intake in the Rat. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 29, 38-45.
- Molander, A., and Soderpalm, B. (2005). Accumbal strychnine-sensitive glycine receptors: an access point for ethanol to the brain reward system. *Alcoholism, clinical and experimental research* 29, 27-37.
- Molander, A., and Söderpalm, B. (2005a). Accumbal Strychnine-Sensitive Glycine Receptors: An Access Point for Ethanol to the Brain Reward System. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 29, 27-37.
- Molander, A., and Söderpalm, B. (2005b). Glycine Receptors Regulate Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 29, 17-26.
- Mulhardt, C., Fischer, M., Gass, P., Simon-Chazottes, D., Guenet, J.L., Kuhse, J., Betz, H., and Becker, C.M. (1994). The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor beta subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. *Neuron* 13, 1003-1015.
- Naito, A., Muchhala, K.H., Trang, J., Asatryan, L., Trudell, J.R., Homanics, G.E., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2015). Manipulations of extracellular Loop 2 in

alpha1 GlyR ultra-sensitive ethanol receptors (USERs) enhance receptor sensitivity to isoflurane, ethanol, and lidocaine, but not propofol. *Neuroscience*.

Nestler, E.J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8, 1445-1449.

Oldham, W.M., and E. Hamm, H. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 39, 117.

Olds, J. (1963). Self-stimulation experiments. *Science (New York, NY)* 140, 218-220.

Olds, J., and Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of comparative and physiological psychology* 47, 419-427.

Perkins, D.I., Trudell, J.R., Crawford, D.K., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2008). Targets for ethanol action and antagonism in Loop 2 of the extracellular domain of glycine receptors. *Journal of Neurochemistry* 106, 1337-1349.

Perkins, D.I., Trudell, J.R., Crawford, D.K., Asatryan, L., Alkana, R.L., and Davies, D.L. (2009). Loop 2 Structure in Glycine and GABAA Receptors Plays a Key Role in Determining Ethanol Sensitivity. *Journal of Biological Chemistry* 284, 27304-27314.

Peters, C., Fernandez-Perez, E.J., Burgos, C.F., Espinoza, M.P., Castillo, C., Urrutia, J.C., Streltsov, V.A., Opazo, C., and Aguayo, L.G. (2013). Inhibition of amyloid beta-induced synaptotoxicity by a pentapeptide derived from the glycine zipper region of the neurotoxic peptide. *Neurobiology of aging* 34, 2805-2814.

Rao, V.R., and Finkbeiner, S. (2007). NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends in neurosciences* 30, 284-291.

Rees, M.I., Lewis, T.M., Vafa, B., Ferrie, C., Corry, P., Muntoni, F., Jungbluth, H., Stephenson, J.B., Kerr, M., Snell, R.G., *et al.* (2001). Compound heterozygosity and nonsense mutations in the alpha(1)-subunit of the inhibitory glycine receptor in hyperekplexia. *Hum Genet* 109, 267-270.

Ren, J., and Greer, J.J. (2006). Modulation of respiratory rhythmogenesis by chloride-mediated conductances during the perinatal period. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 3721-3730.

Ren, J., Ye, J.H., Liu, P.L., Krnjevic, K., and McArdle, J.J. (1999). Cocaine decreases the glycine-induced Cl<sup>-</sup> current of acutely dissociated rat hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol* 367, 125-130.

Russo, S.J., and Nestler, E.J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews Neuroscience* 14, 609-625.

Ryan, S.G., Buckwalter, M.S., Lynch, J.W., Handford, C.A., Segura, L., Shiang, R., Wasmuth, J.J., Camper, S.A., Schofield, P., and O'Connell, P. (1994). A missense mutation in the gene encoding the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor in the spasmodic mouse. *Nat Genet* 7, 131-135.

Salling, M.C., and Harrison, N.L. (2014). Strychnine-sensitive glycine receptors on pyramidal neurons in layers II/III of the mouse prefrontal cortex are tonically activated. *Journal of neurophysiology* 112, 1169-1178.

San Martin, L., Cerda, F., Sanchez, A.A., Jin, C., Aguayo, L.G., and Guzman, L. (2013). Inhibition of the ethanol-induced potentiation of glycine receptor by small peptides and molecules that interfere with G $\beta$  $\gamma$  binding. Poster#: 155.06/AA1 (Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: : Society for Neuroscience).

Sanchez, A., Yevenes, G.E., San Martin, L., Burgos, C.F., Moraga-Cid, G., Harvey, R.J., and Aguayo, L.G. (2015). Control of ethanol sensitivity of the glycine receptor alpha3 subunit by transmembrane 2, the intracellular spliced cassette and C-terminus domain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*.

Sanchis-Segura, C., Borchardt, T., Vengeliene, V., Zghoul, T., Bachteler, D., Gass, P., Sprengel, R., and Spanagel, R. Involvement of the AMPA Receptor GluR-C Subunit in Alcohol-Seeking Behavior and Relapse. *The Journal of Neuroscience* 26, 1231-1238.

Sanz, E., Evanoff, R., Quintana, A., Evans, E., Miller, J.A., Ko, C., Amieux, P.S., Griswold, M.D., and McKnight, G.S. (2013). RiboTag analysis of actively translated mRNAs in Sertoli and Leydig cells in vivo. *PLoS one* 8, e66179.

Sanz, E., Yang, L., Su, T., Morris, D.R., McKnight, G.S., and Amieux, P.S. (2009). Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13939-13944.

Schmid, K., Bohmer, G., and Gebauer, K. (1991). Glycine receptor-mediated fast synaptic inhibition in the brainstem respiratory system. *Respir Physiol* *84*, 351-361.

Sebe, J.Y., Eggers, E.D., and Berger, A.J. (2003). Differential effects of ethanol on GABA(A) and glycine receptor-mediated synaptic currents in brain stem motoneurons. *Journal of neurophysiology* *90*, 870-875.

Sine, S.M., and Engel, A.G. (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* *440*, 448-455.

Slaney, T.R., Mabrouk, O.S., Porter-Stransky, K.A., Aragona, B.J., and Kennedy, R.T. (2013). Chemical gradients within brain extracellular space measured using low flow push-pull perfusion sampling in vivo. *ACS Chem Neurosci* *4*, 321-329.

Smith, B.R., Segal, R.B., and Amit, Z. (1989). Administration of a GABA antagonist selectively attenuates an ethanol-induced conditioned taste aversion. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* *33*, 269-271.

Smith, K.J., Felts, P.A., and John, G.R. (2000). Effects of 4-aminopyridine on demyelinated axons, synapses and muscle tension. *Brain* *123*, 171-184.

Söderpalm, B., Löf, E., and Ericson, M. (2009). Mechanistic studies of ethanol's interaction with the mesolimbic dopamine reward system. *Pharmacopsychiatry* *42 Suppl 1*, S87-94.

Song, Y.M., and Huang, L.Y. (1990). Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons. *Nature* *348*, 242-245.

Spanagel, R. (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* *89*, 649-705.

Specht, C.G., Grunewald, N., Pascual, O., Rostgaard, N., Schwarz, G., and Triller, A. (2011). Regulation of glycine receptor diffusion properties and gephyrin interactions by protein kinase C. *Embo j* *30*, 3842-3853.

Spiers, H.J., and Bendor, D. (2014). Enhance, delete, incept: manipulating hippocampus-dependent memories. *Brain research bulletin* *105*, 2-7.

Tapia, J.C., and Aguayo, L.G. (1998). Changes in the properties of developing glycine receptors in cultured mouse spinal neurons. *Synapse* *28*, 185-194.

Thiele, T.E., Crabbe, J.C., and Boehm, S.L., 2nd (2014). "Drinking in the Dark" (DID): a simple mouse model of binge-like alcohol intake. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley [et al]* 68, 9.49.41-12.

Turrigiano, G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a005736.

Van den Oever, M.C., Spijker, S., and Smit, A.B. (2012). The synaptic pathology of drug addiction. *Advances in experimental medicine and biology* 970, 469-491.

van Zundert, B. (2003). Developmental-Dependent Action of Microtubule Depolymerization on the Function and Structure of Synaptic Glycine Receptor Clusters in Spinal Neurons. *Journal of Neurophysiology* 91, 1036-1049.

van Zundert, B., Alvarez, F.J., Tapia, J.C., Yeh, H.H., Diaz, E., and Aguayo, L.G. (2004). Developmental-dependent action of microtubule depolymerization on the function and structure of synaptic glycine receptor clusters in spinal neurons. *Journal of neurophysiology* 91, 1036-1049.

van Zundert, B., Castro, P., and Aguayo, L.G. (2005). Glycinergic and GABAergic synaptic transmission are differentially affected by gephyrin in spinal neurons. *Brain Res* 1050, 40-47.

Vandenberg, R.J., Ryan, R.M., Carland, J.E., Imlach, W.L., and Christie, M.J. (2014). Glycine transport inhibitors for the treatment of pain. *Trends in pharmacological sciences* 35, 423-430.

Varley, Z.K., Pizzarelli, R., Antonelli, R., Stancheva, S.H., Kneussel, M., Cherubini, E., and Zacchi, P. (2011). Gephyrin regulates GABAergic and glutamatergic synaptic transmission in hippocampal cell cultures. *The Journal of biological chemistry* 286, 20942-20951.

Wadleigh, A., and Valenzuela, C.F. (2011). Ethanol Increases GABAergic Transmission and Excitability in Cerebellar Molecular Layer Interneurons from GAD67-GFP Knock-in Mice. *Alcohol and Alcoholism* 47, 1-8.

Weight, F.F., Lovinger, D.M., White, G., and Peoples, R.W. (1991). Alcohol and anesthetic actions on excitatory amino acid-activated ion channels. *Annals New York Academy of Sciences* 625, 97-107.

Weiner, J.L., Zhang, L., and Carlen, P.L. (1994). Guanosine phosphate analogs modulate ethanol potentiation of GABAA-mediated synaptic currents in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res* 665, 307-310.

Werner, D.F., Blednov, Y.A., Ariwodola, O.J., Silberman, Y., Logan, E., Berry, R.B., Borghese, C.M., Matthews, D.B., Weiner, J.L., Harrison, N.L., *et al.* (2006). Knockin mice with ethanol-insensitive  $\alpha$ 1-containing  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors display selective alterations in behavioral responses to ethanol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319, 219-227.

Wick, M.J., Mihic, S.J., Ueno, S., Mascia, M.P., Trudell, J.R., Brozowski, S.J., Ye, Q., Harrison, N.L., and Harris, R.A. (1998). Mutations of  $\gamma$ -aminobutyric acid and glycine receptors change alcohol cutoff: evidence for an alcohol receptor? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6504-6509.

Williams, K.L., Ferko, A.P., Barbieri, E.J., and DiGregorio, G.J. (1995). Glycine enhances the central depressant properties of ethanol in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 50, 199-205.

Ye, J.H., Sokol, K.A., and Bhavsar, U. (2009). Glycine receptors contribute to hypnosis induced by ethanol. *Alcoholism, clinical and experimental research* 33, 1069-1074.

Ye, J.H., Tao, L., Ren, J., Schaefer, R., Krnjevic, K., Liu, P.L., Schiller, D.A., and McArdle, J.J. (2001). Ethanol potentiation of glycine-induced responses in dissociated neurons of rat ventral tegmental area. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 296, 77-83.

Ye, Q., Koltchine, V.V., Mihic, S.J., Mascia, M.P., Wick, M.J., Finn, S.E., Harrison, N.L., and Harris, R.A. (1998). Enhancement of glycine receptor function by ethanol is inversely correlated with molecular volume at position 267. *Journal of Biological Chemistry* 273, 3314-3319.

Yevenes, G.E., Moraga-Cid, G., Avila, A., Guzman, L., Figueroa, M., Peoples, R.W., and Aguayo, L.G. (2010). Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gbetagamma modulation. *The Journal of biological chemistry* 285, 30203-30213.



Yevenes, G.E., Moraga-Cid, G., Guzman, L., Haeger, S., Oliveira, L., Olate, J., Schmalzing, G., and Aguayo, L.G. (2006). Molecular determinants for G protein  $\beta\gamma$  modulation of ionotropic glycine receptors. *The Journal of biological chemistry* *281*, 39300-39307.

Yevenes, G.E., Moraga-Cid, G., Peoples, R.W., Schmalzing, G., and Aguayo, L.G. (2008). A selective G $\beta\gamma$ -linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 20523-20528.

Yevenes, G.E., Moraga-Cid, G., Romo, X., and Aguayo, L.G. (2011). Activated G protein  $\alpha_s$  subunits increase the ethanol sensitivity of human glycine receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *339*, 386-393.

Yevenes, G.E., Peoples, R.W., Tapia, J.C., Parodi, J., Soto, X., Olate, J., and Aguayo, L.G. (2003). Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits. *Nat Neurosci* *6*, 819-824.

Yevenes, G.E., and Zeilhofer, H.U. (2011a). Allosteric modulation of glycine receptors. *British Journal of Pharmacology* *164*, 224-236.

Yevenes, G.E., and Zeilhofer, H.U. (2011b). Allosteric modulation of glycine receptors. *Br J Pharmacol* *164*, 224-236.

Zahniser, N.R., and Doolen, S. (2001). Chronic and acute regulation of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> -dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacology & therapeutics* *92*, 21-55.

Zhu, L., and Ye, J.H. (2005). The role of G proteins in the activity and ethanol modulation of glycine-induced currents in rat neurons freshly isolated from the ventral tegmental area. *Brain Res* *1033*, 102-108.